

**Untersuchungen zur Gerinnungszeit
des Blutplasmas durch verschiedene
Gewebsthrombokinasen des Karpfens
(*Cyprinus carpio* L.)
in Abhängigkeit von der Temperatur**

Helmut Burzynski

1979

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf und Prof. Dr. H. H. Reichenbach-Klinke

Arbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H. H. Reichenbach-Klinke

Untersuchungen zur Gerinnungszeit des Blutplasmas
durch verschiedene Gewebsthrombokinasen des Karpfens
(*Cyprinus carpio* L.) in Abhängigkeit von der Temperatur

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Helmut Burzynski

aus

Pfaffenhofen/Ilm

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. H.-H. Reichenbach-Klinke
Korreferent: Prof. Dr. H. Kraft

Tag der Promotion: 23. Februar 1979



Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

Meiner lieben Mutter

in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0059

INHALTSVERZEICHNIS

- A) EINLEITUNG
- B) LITERATURÜBERSICHT
 - 1. Allgemeines zur Blutgerinnung
 - 2. Blutgerinnung beim Fisch
- C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN
 - a) Material und Methode
 - 1. Versuchsfische und Hälterung
 - 2. Blutentnahme
 - 3. Herstellung der Gewebsthrombokinasen
 - 4. Bestimmung der Gerinnungszeit der einzelnen Gewebsthrombokinasen
 - 5. Prinzip der Thromboplastinzeitbestimmung
 - 6. Plasma-Fibrinogenbestimmung
 - b) Ergebnisse der Versuche
 - 1. Thromboplastinzeit der Karpfen, die bei 10° C Wassertemperatur gehältert wurden
 - 2. Thromboplastinzeit der Karpfen, die bei 25° C Wassertemperatur gehältert wurden
 - 3. Fibrinogengehalt der Karpfenplasmen des Kalt- und Warmwasserversuches
 - 4. Statistische Berechnung der gemessenen Werte und Auswertung
- D) DISKUSSION
- E) ZUSAMMENFASSUNG
- F) SUMMARY
- G) LITERATURVERZEICHNIS

A) EINLEITUNG

Fischblut gerinnt bekanntlich wesentlich schneller als das der Säuger. Da die Gerinnung bei den Säugetieren ein vornehmlich enzymatischer Vorgang ist, bei dem auch die Gewebsthrombokinase eine große Rolle spielt, soll es Ziel dieser Arbeit sein, herauszufinden, ob die Thrombokinase in den verschiedenen Organen des Karpfens vorhanden und ob ihr ähnliche Bedeutung wie bei den Säugetieren beizumessen ist. Enzymatische Reaktionen sind temperaturabhängig, so daß es von Bedeutung ist zu erfahren, ob für das Gerinnungssystem des Karpfens als poikilothermes Tier diese Tatsache ebenfalls zutrifft. Aus diesem Grunde wurden erstens die Fische bei verschiedenen Wassertemperaturen gehältert, und zweitens die Wasserbadtemperaturen der Gerinnungsvorgänge variiert.

LITERATURÜBERSICHT

1. Allgemeines zur Blutgerinnung

Im Blutgerinnungsprozeß werden drei Phasen unterschieden:

1. Plasma-Thromboplastinkomplex
2. Thrombinkomplex
3. Fibrinbildung.

In der 1. Phase kommt es durch endogene oder exogene Einflüsse zu Agglutinationen und zum Zerfall der Blutplättchen. Dadurch werden sogenannte Plättchenfaktoren frei. Plättchenfaktor III verursacht nun im endogenen System zusammen mit Faktor V (Accelerin); F VIII (antihämophiles Globulin); F IX (Christmasfaktor); F X (Stuart-Prower); F XI (Plasma-thromboplastin -Antecedent PTA) und F XII (Hageman) die Reaktion, die die Blutthrombokinase bildet. Dieser gesamte Vorgang ist nur bei Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen (F IV) möglich. Bei Gewebsschädigungen wird Gewebsthromboplastin freigesetzt. Hierbei sind die Faktoren V und VII (labiler und stabiler Faktor), Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) und Ca^{++} -Ionen notwendig. Das aktive Thromboplastin ermöglicht in der 2. Phase die Bildung von Thrombin aus Prothrombin, das wiederum aus seiner Vorstufe, dem Prothrombinogen entsteht. Dazu sind die Faktoren V, VII, X und Ca^{++} notwendig. Bei Phase 3 führt das Thrombin das Fibrinogen in Fibrin über. Faktor XIII (fibrinstabilisierender Faktor FS F) ist für die Umwandlung von Fibrin zu einem unlöslichen Fibringerinnsel durch Polymerisation verantwortlich. Er liegt in einer inaktiven Form vor und wird durch Thrombin in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen aktiviert. Faktor XIII verschwindet fast ganz, nachdem die Gerinnung abgeschlossen ist. Plättchenfaktor 2 beschleunigt die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin. Im innern System wird die Gerinnung durch die

Aktivierung des Hageman-Faktors eingeleitet, der dann eine Kaskade hintereinander geschalteter Aktivierungen in Gang setzt. MACFARLANE (1964) nimmt an, daß der Gerinnungsvorgang eine "Cascade" der Verwandlung von Pro-Enzymen zu aktiven Enzymen ist, die in eine Prothrombin-aktivierung zu Thrombin ausläuft.

In der Phase der Nachgerinnung erfolgt die Retraktion des Fibrinnetzes durch Einwirkung der Thrombozyten auf die Fibrinmaschen und Auspressung des Serums. Sie ist abhängig von der Anzahl und Funktionstüchtigkeit der Thrombozyten (Tab. 1).

Ähnlich wie bei der Blutgerinnung kann man die Fibrinolyse ebenfalls in 3 Phasen einteilen. Am Ende der ersten steht die Bildung eines Plasminogen-Aktivators, der sowohl intravasal als auch durch Gewebefaktoren induziert werden kann. Durch den Plasminogen-Aktivator wird das Proenzym Plasminogen in das aktive Plasmin umgewandelt (Phase 2), das Proteinase-Funktion entfaltet und das Fibrin zu löslichen Spaltpeptiden abbaut (Phase 3) (MEYER-BERTHENRATH, 1973).

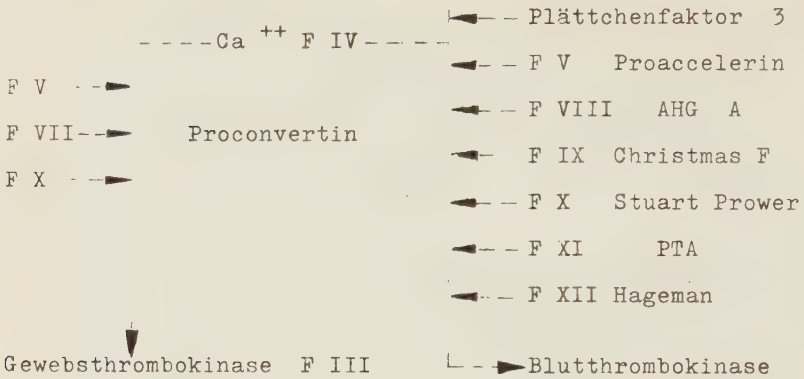
Die Fähigkeit des Blutes zu gerinnen, ist eine Eigenschaft, die die Wirbeltiere und auch manche Wirbellose (höhere Krebse, Insekten, einige Mollusken) besitzen. Eine hohe Differenzierung des Blutbildes tritt erst im Blut der Wirbeltiere auf. In der in Gewebsspalten auftretenden Flüssigkeit der Coelenteraten, Plathelminthen und Appendicularien (Tunicaten) sind noch keine besonderen Zellen vorhanden, bei den übrigen Wirbellosen, einschließlich Branchiostoma, enthält Blut nur kleine amöboide Zellen (Leukozyten).

Tabelle 1: Schema der Blutgerinnung

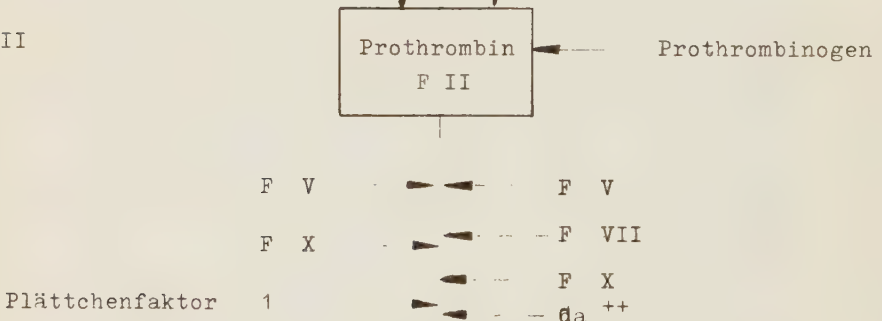
Exogenes System

Endogenes System

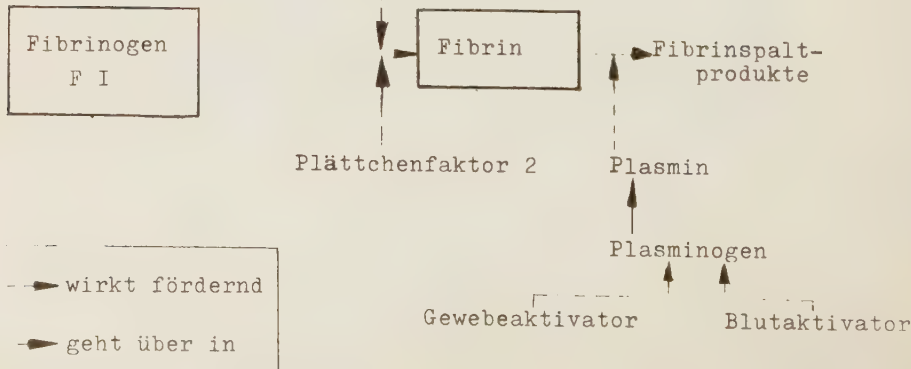
Phase I



Phase II



Phase III



Blutplasma des Regenwurms enthält bereits Hämerythrin kupferhaltiges Hämocyanin bewirkt die blaue Blutfarbe mancher Muscheln, Schnecken und höherer Krebse.

Ebenso ist ein Anstieg der Konzentration von physiologischer Kochsalzlösung als isotonische Lösung für das Blut entwicklungsgeschichtlich zu erkennen. Beträgt sie beim Frosch 0,6 %, so beträgt sie beim Fisch 0,89 %, um sich beim Warmblüter auf 0,9 % zu erhöhen.

Bei den Erythrozyten ist ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen Säugern und Nichtsäugern zu erkennen. Von den Hemicranioten bis zu den Sauropsiden sind sie kernhaltig. Kerne und Mitochondrien fehlen dagegen den Säugern. Ihre Zahl steigt analog der phylogenetischen Entwicklung. Beträgt sie beim Frosch ungefähr $0,4 \text{ Mio/mm}^3$, so können im Karpfen $1,2 - 1,9 \text{ Mio/mm}^3$ (TOPF, 1955) gezählt werden, wogegen der Mensch rund $4 - 5 \text{ Mio/mm}^3$ Blut besitzt.

Die Lymphozyten des Karpfens liegen zahlenmäßig in weitem Abstand hinter den Erythrozyten. Ihr Kern ist außerordentlich chromatinreich. Er erscheint mehr oder weniger rund. Das Protoplasma ist ein dünner Saum. Die Leukozyten sind große runde Zellen von 12μ Durchmesser. Ihr Kern ist stets randständig, chromatinreich, doch von etwas lockerer Struktur als der der Lymphozyten. Das gesamte Plasma ist durchgehend von zarten Granulationen erfüllt, die neben wolkigen Aufhellungen zu sehen sind. Im Kubikmillimeter Blut sind etwa 75.000 - 90.000 Leukozyten enthalten, was einem Verhältnis gegenüber den Erythrozyten von 1:17 - 20 entspricht (DOMBROWSKI, 1953).

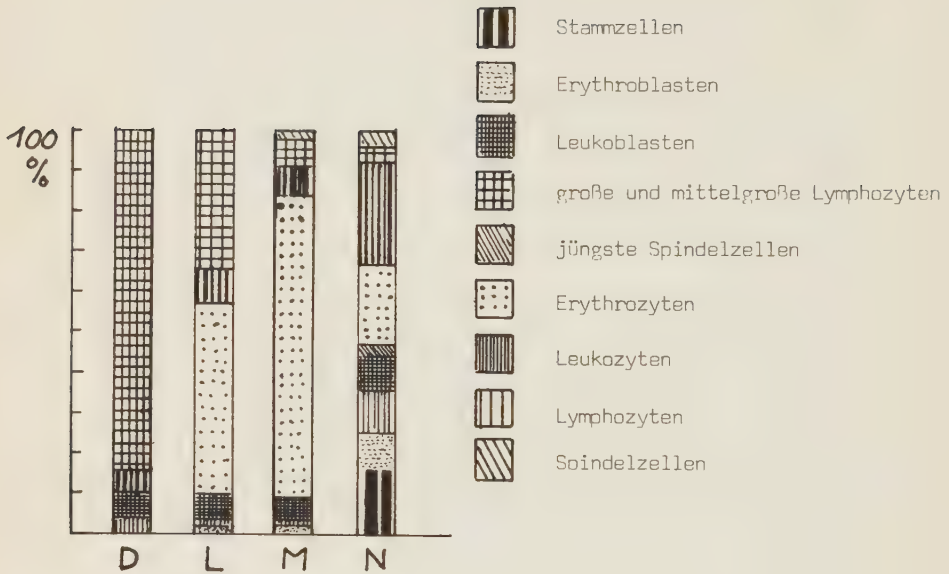


Abb. 1

Prozentuale Verteilung der verschiedenen Blutzellen in Darm (D), Leber (L), Milz (M) und Nieren (N) eines Karpfens (*Cyprinus carpio*). Diese Werte entsprechen den Medianwerten dreier Auszählungen von je 100 Zellen verschiedener Abklatschpräparate eines Individuums (nach HAINER, 1958).

2. Blutgerinnung beim Fisch

DOMBROWSKI (1953) beschrieb die Thrombozyten als "sehr kleine, runde bis polygonale Elemente von $0,5 - 0,75 \mu$ Durchmesser." Zahlenmäßig sollen sie die Erythrozyten um das 2 - 3,5fache übertreffen und mit ihrer hohen Zahl einen wesentlichen Anteil an der Blutgerinnung haben. Gebildet werden die Thrombozyten seiner Meinung nach aus den Thrombozytoblasten, die sie durch Abschnürung von Kernanteilen ins freie Blut austreten lassen. Nach NANCY, NEALE HONN und CHEVIN (1977) haben die Thrombozyten im weißen Blutbild des Kalif. Stierkopffisches einen Anteil von rund 52 %.

TOPF (1955) konnte beim Karpfen keine Spindelzellen feststellen. Er beobachtete nur kreisrunde Thrombozytoblasten mit einer Größe von $13,4 - 14,1 \mu$. Ihr Bildungsorgan ist ausschließlich die Niere.

Im Gegensatz dazu sah HAIDER (1967) keine Thrombozytoblasten im Blut. Er definierte die "reife Spindelzelle" der Knochenfische als eine schmale, langgestreckte, an den beiden Schmalseiten gleichmäßig abgerundete Zelle. Sie ist charakterisiert durch den im Vergleich zur ganzen Zelle großen, zentral gelegenen langen, dünnen Kern und den ihn umgebenden schmalen, zarten, sehr hyalinen Plasmasaum. Ihre Größe bewegt sich bei den untersuchten Fischarten zwischen einer Länge von $4,8 - 16,4 \mu$ und einer Breite von $2,4 - 8,16 \mu$. Er ordnete ihr eine selbständige lückenlose Reifungsreihe zu. Eine Eingliederung in die rote Reihe erschien ihm äußerst schwierig und wenig natürlich. Ihre Funktion entsprach völlig dem Verhalten der Blutplättchen der Säuger.

FEY (1966) studierte den Gerinnungsvorgang phasenoptisch an den Spindelzellen des Karpfens. Dabei stellten die Zellen nach einer gewissen Zeit ihre Fortbewegung ein und breiteten sich flach auf der Unterlage aus, wobei sich ihr Plasma um ein Mehrfaches ausdehnte. Die Kernstruktur wurde allmählich undeutlich. Dann entstanden plötzlich lange, meist gerade vom Zytoplasma ausgehende Fibrinfäden, die auf die umliegenden Erythrozyten einen richtenden Einfluß ausübten. Nach Ausbildung dieser Fibrinfäden disintegrierten Plasma und Kern allmählich.

HAIDER (1967) bestätigte diese Beobachtungen bei Untersuchungen an Spindelzellen der Regenbogenforelle vollauf.

GARDNER und YEVICH (1969) sprachen bei ihren Untersuchungen an Kärpflingen ebenfalls von Thrombozyten, die sich aus den Prothrombozyten und verschiedenen Zwischenformen entwickelten. Sie charakterisierten die Prothrombozyten als ovale oder tränenartige Zellen mit einem großen ovalen Kern und einem knappen Rand von viskösem blaugefärbtem Zytoplasma. Die reifen Thrombozyten bildeten gewöhnlich einige lange, dünne Fortsätze, die sich mit denen anderer Thrombozyten verbanden, um ein dichtes thrombotisches Netzwerk zu bilden.

LEHMANN und STÖRENBERG (1975) schlossen sich der Theorie HAIDERS von einer selbständigen Blutreihe an, sahen aber ein sogenanntes Blasenstadium der Spindelzelle nicht eindeutig. Bei ihnen kamen im peripheren Blut regelmäßig lediglich die Vorstufen der reifen Spindelzelle vor. Zellform sowie Zellkern der Vorstufe wiesen stets die Tendenz zur Ovalität auf. Der Zellkern war unscharf begrenzt, zentral gelegen und besaß ein dichtes Chromatingerüst ohne Aufhellungen. Das Zytoplasma bildete einen schmalen Saum, der eine mehr oder weniger starke Basophilie aufwies. Eine Granulation fehlte. Mit zunehmender Reifung streckte sich die Zelle. Außerdem stellten sie bei der Spindelzelle eine phagozytäre Eigenschaft fest.

BOCENRIEDER (1950) maß die postmortale, intravasale Blutgerinnungszeit bei verschiedenen Fischen und setzte sie unterschiedlichen Temperaturen und Noxen aus. Die Bestimmung erfolgte makroskopisch im Atrium. Dabei kam er zu dem Ergebnis, "daß je geringer die Wasserbad-Temperatur, desto größer die Blutgerinnungszeit war." Die Werte schwankten von 6 Stunden bei 8° C bis nur 3 Stunden bei 35° C. Noxen wie Sauerstoffmangel, Kaliumcyanid und Schwefelwasserstoffvergiftung und pH-Wertschwankungen verzögerten die totale Gerinnung zum Teil erheblich, zum Teil ließen sie nur eine unvollständige Gerinnung zu.

FLEMMING (1954) stellte einen sehr hohen Fibrinogengehalt im Karpfenblut fest. Seine Werte differierten zwischen 0,5 g% und 1,8 g%. Damit erklärte er sich auch die rasche Gerinnungszeit von 30 - 60 Sekunden. Beim Katzenwels betrug der Fibrinogengehalt des Plasmas 124 - 394 mg% mit einem Mittelwert von 260 mg% (LANGDELL, 1965). Im Gegensatz zu DOMBROWSKI (1953), der eine geringe Ausbildung eines Blutkuchens beschrieben hatte, bildete sich nach Flemming (1954) ein festes Gerinnsel mit zehnminütiger deutlicher Retraktion. Er begründet den negativen Befund Dombrowskis über den Fibrinogengehalt damit, daß hier Blutserum untersucht worden war, das von Haus aus kein Fibrinogen enthält, aber Thrombin und Faktor VI.

JARA (1957, 1961) untersuchte das Blutgerinnungssystem beim Karpfen. Dabei stellte er eine Blutungszeit nach Einschnitt in die Schwanzflosse von 5 - 8 Minuten fest. Einer Verletzung der Muskelgefäße mit einer Lanzette folgte jedoch eine Gerinnung des Blutflusses an der Wundoberfläche in wenigen Sekunden. Blut, aus dem Bulbus arteriosus genommen, gerann auf einem nicht

paraffinisierten Uhrglas bei Raumtemperatur in durchschnittlich 45 Sekunden. Die Wasserbad-Temperatur spielte eine nicht allzu geringe Rolle. Im nicht paraffinisierten Röhrchen trat eine Gerinnung bei Raumtemperatur nach 7 Minuten, bei 37° C bereits nach 4 Minuten ein. Destilliertes Wasser ließ Plasma koagulieren, wogegen physiologische Kochsalzlösung keine Verklumpung hervorrief. In späteren Versuchen ergänzte JARA (1961) diese Versuche mit hypotonischen NaCl-Lösungen, die ebenfalls das Plasma gerinnen ließen. Die Verdünnung des Plasma mit Aqua dest. mußte seiner Meinung nach eine aktivierende Wirkung auf die Thrombinbildung zur Folge haben. Die Prothrombinzeit von oxaliertem Plasma betrug bei 37° C durchschnittlich 6,8 Sekunden. Nachdem das Plasma einen Monat bei Kühlschranktemperatur von 4° C gehalten wurde, verlängerte sie sich auf durchschnittlich 120 Sekunden. Nach Hinzufügen von 1/10 Vol. frischem Karpfenplasma, das mit Bariumkarbonat adsorbiert wurde, sank die Thromboplastinzeit des gelagerten Plasmas auf 60 Sekunden. Es mußte also ein labiler Faktor im Karpfenplasma vorhanden gewesen sein. Eine Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung um das Vierfache führte zu Werten von etwa 16 Sekunden, achtfach verdünnt 25 Sekunden. Das Gerinnungssystem des Karpfens zeigt seiner Meinung nach ein besonderes Verhalten, nämlich im Gegensatz zu den Säugern kann man das Plasma sofort von Fischblut ohne Anticoagulantien erhalten, wenn sich bereits eine Spur von Thrombin und von Klümpchen gebildet hat. JARA (1961) verglich diese Erscheinung mit der Hämophilie des Menschen. Das Blutgerinnungssystem des Karpfens stellte er grundsätzlich dem der Säuger gleich. Er fand sowohl ein Prothrombin als auch einen Plasmathromboplastinkomplex. Der Prothrombinkomplex enthielt Proaccelerin (F V), Proconvertin (F VII)

und den Stuart-Prower-Faktor (F X) oder ihre Analoga, wobei F X eine sehr hohe Aktivität besaß. Außerdem enthielt Karpfenserum einen beträchtlichen Teil an Prothrombin, der beim Menschen nur in Spuren vorkommt. "Im Karpfenblut wurde, wie beim Menschen, während des Prozesses der Thrombinogenese das Erscheinen eines Aktivators beobachtet - Autothrombin C. Dieses Phänomen ist für den autolytischen Charakter der Thrombinbildung verantwortlich. Wie beim Menschen wurde ein Verlust der natürlichen Aktivatoren beobachtet. Dieses Phänomen ist der Grund für die Begrenzung der Thrombinbildung" (JARA, 1961). Die bestehenden Unterschiede zwischen Fisch und Säugern sind nach JARA in der Regel quantitativer Natur und betreffen den Spiegel der Teilkomponenten des Gerinnungssystems.

WOLF (1959) fand ebenfalls heraus, daß Wasser die Gerinnungszeit um ein Drittel verkürzt. Fischerythrozyten ließen bei Berührung mit Wasser eine Substanz entstehen, die sich in eine einheitliche gallertartige Masse umformte. Diese Reaktion lief sehr schnell ab (innerhalb einer Minute) und war für ihn für die Bereitschaft der Blutgerinnung verantwortlich; ein Beweis für die Anpassung des Fisches an das Wasser.

DOOLITTLE und RUSSELL (1962) stimmen der Annahme JARAS, daß sich im Plasma Prothrombin befindet, bei. Sie untersuchten Meeresneunaugen, Hundshai und Blackfisch und fanden heraus, daß Blackfischblut ohne Anticoagulantien und bei sorgfältiger Verhinderung einer Gewebskontamination sehr schnell im Glasröhrchen gerann. Hundshai-blut dagegen kam sehr langsam zur Gerinnung, und das Meeresneunauge bildete einen schwachen, kaum geordneten Klumpen nach 24 Stunden bei Raumtemperatur. Sie fügten Meeresneunaugengewebsextrakt zu und erzielten innerhalb einer Minute eine starke Verklumpung. Calcium in hoher Konzentration beschleunigte die Gerinnung des

"Intrinsic Systems". Ein Hinzufügen von Thrombozyten rief ebenfalls eine starke Beschleunigung der Gerinnung des inneren Systems hervor.

Als spezifischer Inhibitor der Gerinnung beim rekalkifizierten Hundshaiplasma stellte sich eine sehr geringe Konzentration von Tosyl-L-Methylester (TAME) heraus (DOOLITTLE, 1963). Bei einer normalen Gerinnungszeit von 7 Minuten erhöhte sie sich bei einer Konzentration von 5 mM auf etwa 300 Minuten. Im äußeren System riefen wäßrige homologe Gewebsextrakte eine starke Beschleunigung der Gerinnung hervor, wobei die Haut als die größte Quelle befunden wurde.

Bei Versuchen mit heterologen Thrombinen und Fibrinogenen stellten RUSSEL und DOOLITTLE (1962) fest, daß Neunaugenthrombin Neunaugenfibrinogen annähernd 30 mal schneller gerinnen ließ als Rinderfibrinogen, wogegen bei Säugerthrombinen eine relativ gute Gerinnung von Neunaugenfibrinogen hervorgerufen wurde.

LANCDELL, (1965) ließ Katzenwelsplasma mit verschiedenen Säugerthromboplastinen (Mensch, Hund, Kaninchen) reagieren und fand dabei heraus, daß die schnellste Gerinnung mit den homologen Extrakten, also Thromboplastin, aus dem Gehirn des Katzenwelses erfolgt.

Bei Kabeljauplasma trat der erste Fibrinfaden bei 0° C nach 2700 Sekunden auf. Die schnellste Gerinnung erfolgte in 88 Sekunden bei 30° C. Bei darüberliegenden Temperaturen verzögerte sich die Prothrombinzeit, um bei 37° C keine meßbaren Werte mehr anzuzeigen (MACNAB, RONALD, 1965). Kabeljauplasma gerann bei 7° C gleich gut mit Kabeljau- und Kaninchenthromboplastin (durchschnittlich 530 Sekunden), wogegen Humanplasma mit Kanin-

chenthromboplastin wesentlich schneller reagierte als mit Kabeljauthromboplastin.

KOMATSU und MILLER (1970) untersuchten die Blutgerinnungszeiten von 4 verschiedenen Fischen und verglichen sie mit denen von 2 Säugern bei niederen und hohen Temperaturen. Fische, die nahezu bei 0° C leben (*Trematomus borchgrewinki* und *Salmo gairdneri* Richardson) hatten bei niederen Temperaturen sehr schnelle Gerinnungszeiten. Das Blut gerann bei 20° C und 30° C noch schneller, jedoch zeigte es gar keine oder eine sehr schlechte Gerinnung bei noch höheren Temperaturen. Menschen- und Kaninchenblut gerann bei 37° C relativ schnell und erfuhr eine enorme Steigerung, als die Temperaturen um etwa 15° C auf etwas über 50° C angehoben wurde, jedoch fand dann, ähnlich wie beim Fisch, bei 30° C und noch höheren Temperaturen eine irreversible Inaktivierung der Gerinnung statt.

Das Blut von *Cyprinus carpio* und *Catostomus occidentalis* hatte Gerinnungseigenschaften, die zwischen den Kaltwasserfischen und den Säugern lagen.

Nach FEENEY (1974) ist das Blutgerinnungssystem ein kompliziertes System, das von vielen biochemischen Kontrollen sorgfältig ausgeglichen wird. Einen Zusammenhang zwischen den Blutgerinnungssystemen der Vertebraten könnte man daran erkennen, daß die Gerinnung bei Kaltwasserfischen bei niederen Temperaturen sehr leistungsfähig ist, bei höheren aber eine Empfindlichkeit zeigt.

BELSARE (1975) maß die Blutgerinnungszeit an 4 verschiedenen kleinen Welsarten und ermittelte Werte zwischen 30 und 48 Sekunden.

C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

a) Material und Methode

1. Versuchsfische und ihre Halterung

40 zweisömmerige gesunde Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) aus einem oberbayerischen Teichgut wurden bei 10° C Grundwassertemperatur in einem 10.000 l Becken gehalten. Das Gewicht der Karpfen betrug durchschnittlich 975 g (840 g - 1.200 g), mit einer durchschnittlichen Länge von 34 cm (30 cm - 37 cm) und einer Höhe von 14 cm (11 cm - 18 cm). Kleinere Tiere hatten sich deshalb nicht geeignet, da sie die Blutmenge, die für die Versuche nötig waren, nicht erbrachten.

Die Versuche fanden im Zeitraum von Juli 1974 bis März 1975 statt. Das Wasser wechselte stetig, die Luft wurde mit Hilfe eines Luftansaugrohres, das mit dem Wasserzuführungsrohr verbunden war, zugeführt. Gefüttert wurden die Karpfen mit Fischfertigfutter (Pellets).

Für den Warmwasserversuch bei 25° C Wassertemperatur wurden jeweils 5 gesunde Karpfen, deren Gewicht und Größe bereits erwähnt wurde, aus dem gleichen Teichgut in je zwei 300 l Becken gesetzt. Der Zu- und Ablauf des Trinkwassers erfolgte ständig. Die Aquarientermperierung von 25° C erfolgte mit Hilfe einer Mischbatterie. Gefüttert wurden die Karpfen ebenfalls mit Pellets. Die Belüftung erfolgte mit Hilfe einer Wisa-Pumpe. Die Zeit der Anpassung an die hohe Temperatur betrug 14 Tage.

2. Blutentnahme

Betäubt wurden die Fische in einer Lösung von 1 g/1000 ml 1,1,1-Trichlor-2-methyl-2-propanol, deren Temperatur jeweils der in der Hälterung entsprach, um einen etwaigen Temperatur-Schock zu vermeiden. Die Blutentnahme erfolgte mittels Herzpunktion. Dabei wurden innenpolierte V 2 A-Kanülen verwendet. Um eine Verunreinigung zu vermeiden, wurde die Einstichstelle mit einem Alkohol-Tuch vorher gereinigt und die ersten Blutropfen verworfen. Als Vorlage dienten 0,2 ml 3,8 prozentiges Natriumcitrat, die man auf 2 ml mit Fischblut zur Gewinnung des Plasmas auffüllte. Das Citratblut wurde sofort 5 Minuten bei 2.000 Umdrehungen zentrifugiert. Mit einer Blutpipette wurde das hämolysefreie Plasma abgesaugt und bis zur Verwendung bei Kühlschranktemperatur von 4° C aufbewahrt.

Pro Fisch erhielt man etwa 10 ml Plasma.

Die Anfertigung von Blutausstrichen und deren Beurteilung erfolgte von allen Karpfen, um das Problem der Blutgerinnung auch histologisch etwas beleuchten zu können. In allen Ausstrichen konnten Spindelzellen gefunden werden (Abb. 2 und 3).

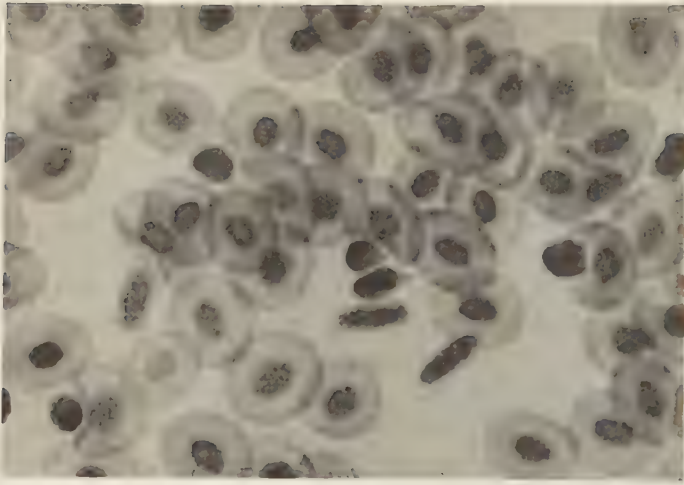


Abb. 2

Spindelzellen beim Karpfen - hyaliner Plasmasaum erkennbar (Färbung nach Pappenheim, Verg. 320fach)

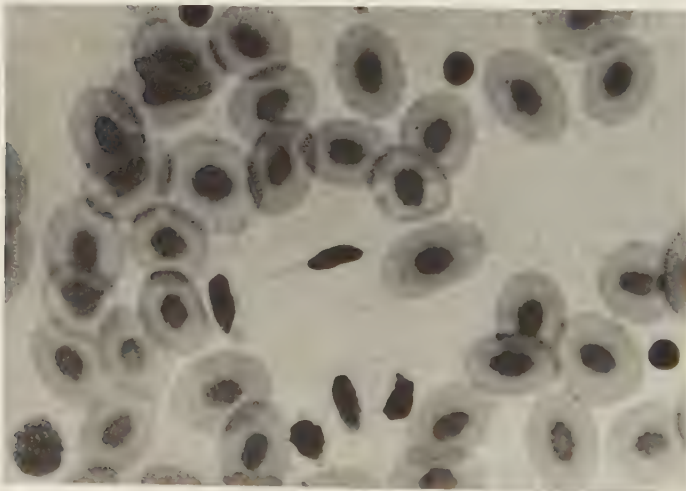


Abb. 3

Reife Spindelzelle mit dünnem Plasmasaum
(Mitte des Bildes)
(Färbung nach Pappenheim, Verg. 320fach)

3. Herstellung der Gewebsthrombokinasen

Um das Gehirn der Tiere nicht zu zerstören, betäubte man die Fische nicht durch einen Schlag auf den Kopf, sondern verwendete als Narkosemittel 1,1,1-Trichlor-2-Methyl-2-propanol, welches dem Wasser in einer Konzentration von 1 g/1000 ml zugegeben wurde. Für die weiteren Untersuchungen wurden folgende Gewebsteile benötigt: Gehirn, Herz, Leber, Milz, Niere, Kiemen, Muskulatur, Haut und Schleim. Alle Proben wurden durch mehrmaliges Waschen mit Leitungswasser, und zum Schluß mit Aqua dest., von Blut und mit Hilfe einer Schere und einer Pipette von Blutgefäßen befreit. Kiemen, Muskulatur und Haut mußten wegen ihrer festen Konsistenz vor dem Zerreiben im Mörser mit einer Schere kleingeschnitten werden. Aus dem Schleim, der mit einem Messer von der Haut abgestrichen wurde, mußten mit einer Pinzette säuberlich alle etwaigen Hautreste und Schuppen entfernt werden. Daraufhin wurden alle Proben 3 mal mit "Aceton p.a." versetzt und zu einem Brei verrieben, wobei man das Überstehende Aceton jeweils abgoß. Die so behandelten Proben, auf ein Filterpapier ausgebreitet, wurden über Nacht zum Trocknen gelegt. Waren die Organproben getrocknet, wurden sie durch ein feines Haarsieb zu Pulver zerrieben, das dann entweder sofort für einen Versuch verwendet wurde, oder bei -20°C im geschlossenen Röhrchen für kurze Zeit aufbewahrt werden konnte.

80 mg der jeweiligen Organprobe wurde mit 2 ml einer 0,89 %igen NaCl-Lösung vermischt und 20 Minuten bei genau 50°C inkubiert, wobei die Zentrifugengläser öfters geschüttelt werden mußten.

Nach einer fünfminütigen Zentrifugierung bei 2.000 Umdrehungen pro Minute wurde vorsichtig die überstehende Flüssigkeit abpipetiert und die gleiche Menge der so gewonnenen Gewebsthrombokinasen mit der gleichen Menge $\text{M}/40 \text{ CaCl}_2$ -Lösung vermischt.

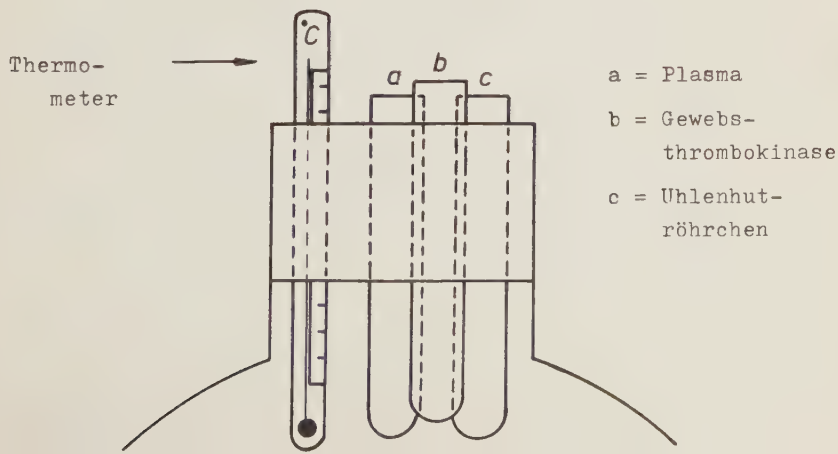
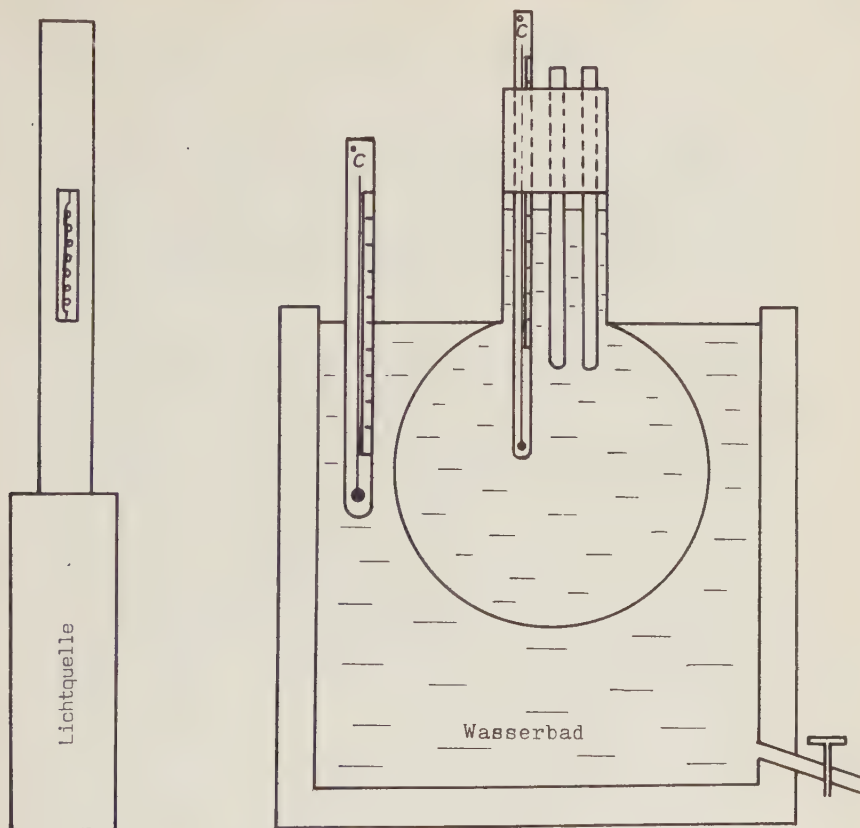
Dies war die fertige Lösung.

4. Bestimmung der Gerinnungszeit der einzelnen Gewebsthrombo- kinasen

Gemessen wurden die einzelnen Gerinnungszeiten modifiziert nach "Quick" (1935) in Uhlenhutröhrchen. In einem mit Wasser gefüllten Glaskolben, dessen Hals extra breit war, wurden Plasma, Ca Cl_2 -Thrombokinese und das leere Uhlenhutröhrchen hineingestellt und die Proben mit Hilfe eines mit Thermostat und Wasserumwälzung ausgerüsteten Wasserbades auf den gewünschten Temperaturen gehalten. Diese betrugen entweder 37°C , 25°C oder 15°C . 0,1 ml Plasma wurden mit der Eppendorf-Mikropipette vorgelegt und 0,2 ml Ca Cl_2 -Thrombokinese-lösung dazugegeben. Beim letzten Tropfen setzte man die Stoppuhr in Gang und häkelte mit einem ausgeglühten und in Aqua dest. abgekühlten Platinhaken so lange darin, bis der erste Fibrinfaden hängen blieb. Die Bildung des ersten Fibrinfadens wurde als Thromboplastinzeit (TPZ) definiert (Abb. 4).

Abb. 4

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung



5. Prinzip der Thromboplastinzeitbestimmung

Gibt man zu Citratplasma im Überschuß Gewebsthrombokinasen und Calcium zu, so verläuft die Gerinnung proportional dem Gehalt des Plasmas an Prothrombin, Faktor V - XI und Fibrinogen. Die Zeit vom Zusatz des Calciums bis zum Gerinnungseintritt bezeichnet man als Thromboplastinzeit (TPZ) (Müller-Seifert, 1966).

Bei Mangel an Gerinnungsfaktoren, die für diese Phase verantwortlich sind (F V, VII, X) oder bei Störung der Fibrinbildung ist die Thromboplastinzeit verlängert. Mit ihr wird die Plasmakonzentration der Gerinnungsfaktoren des exogenen Systems geprüft. Ein prozentualer Vergleich, wie er in der Humanmedizin üblich ist, konnte hier nicht dargestellt werden, da beim Karpfen die dafür notwendigen Vergleichswerte für physiologische Gerinnungszeiten fehlten. Deshalb mußten die Gerinnungszeiten in Sekunden berechnet werden.

6. Plasma-Fibrinogenbestimmung

Die Hitzefibrinbestimmung nach Schulz führte beim Karpfenplasma zu keinem Ergebnis, da trotz Erhöhung der Temperatur auf über 56°C kein gallertartiger Ausfall festzustellen war. Aus diesem Grunde erfolgte die Bestimmung nach der Biuret-Methode: 0,2 ml Plasma wurden mit 1 ml 0,89 %iger Kochsalzlösung und 1 ml 22,5 molarer Calciumchloridlösung vermischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Röhrchen wurde danach bei einer Temperatur von -20°C kurz gefroren, nach dem Auftauen das Fibringerinnsel mit einem Platinhaken herausgefischt, in 0,89 %iger Kochsalzlösung gut gewaschen und anschließend wurde das gallertartige Klümpchen auf ein Filterpapier gebracht.

Nach der Trocknung löste man das Gerinnsel über einen Zeitraum von 1 Stunde in 1 ml 0,75 molarer Natronlauge auf. Für die photometrischen Bestimmungen des Fibrinogengehaltes wurde 1 ml Biuret-Reagenz dazugegeben. Der Leerwert setzte sich aus 1 ml Natronlauge, 0,04 ml Aqua dest. und 1 ml Biuret-Reagenz, der Standardwert aus 1 ml Natronlauge, 0,04 ml Standardlösung (Standard-Human-Plasma der Firma Behring) und 1 ml Biuret zusammen. Die Extinktion wurde innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen.

Berechnet wurde der Fibrinogengehalt nach der Formel:

$$\frac{\text{Ext. UP}}{\text{Ext. St}} \times \text{KonzSt} = \text{gGesamt-EW in UP}$$

Ext.UP = Extinktion der Untersuchungsprobe

Ext.St = Extinktion des Standardwertes

KonzSt = Konzentration des Standardwertes

b) Ergebnisse der Versuche

1. Thromboplastinzeit der Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden

Jede Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) erfolgte dreifach. Aus den erhaltenen Werten wurde das arithmetische Mittel errechnet. Die Berechnungs-Methode gilt auch für die Werte, die von den bei 25° C gehälterten Karpfen gewonnen wurden. Da die Masse der mit Aceton getrockneten Karpfengehirne und Karpfenherzen teilweise so gering war, mußte mit den Gehirnen und Herzen anderer Karpfen gepoolt werden. Meistens waren 4 Fische notwendig, um die erforderliche Menge an Thrombokinasen zu erhalten. Mehr als fünf Tiere wurden für eine Versuchsreihe nie genommen, da die dafür beanspruchte Zeit von einem Tag die Aktivität der Thrombokinasen gemindert hätte. Das hierfür benötigte frische Blutplasma wurde von den anderen gehälterten Karpfen durch die bereits erwähnte Herzpunktion gewonnen. Hämolysiertes Plasma fand keine Verwendung. Um immer gleichbleibende Lichtverhältnisse zu haben, beleuchtete die im Glaskolben befindlichen Uhlenhutröhrchen eine kleine Neonlampe. Außerdem vergörberte die Rundung des Glaskolbens die Vorgänge. Um einen gewissen Vergleich zu Gerinnungswerten vom Menschen zu haben, wurde eine Meßreihe bei 37° C vorgenommen. Da aber der Karpfen in einem so hohen Temperaturbereich nicht lebt, wurden die Messungen ebenfalls bei 25° C, einer Temperatur, die ihm sehr wohl zuspricht und bei 15° C, einem Bereich, den man etwa als Durchschnittstemperatur in unseren Breiten annehmen kann, durchgeführt. Es sollte bei diesen Versuchen geklärt werden, ob unterschiedliche Temperaturbereiche den Gerinnungsvorgang beeinflussen. Einer der Hauptaufgaben dieser Versuchsreihe war es jedoch, festzustellen, ob und in welcher Menge die Gewebe anderer Organe außer dem Gehirn ebenfalls Thrombokinasen enthalten.

Die nun folgenden Tabellen 2 - 9 stellen die gemessenen Werte dar.

Die folgenden Thromboplastinzeiten sind bereits Mittelwerte, die von allen Versuchsfischen ermittelt wurden. Dies gilt auch für den Warmwasserversuch. Die einzelnen Werte können aus den Tabellen entnommen werden.

Bei einer Wasserbadtemperatur von 37⁰ C gerann das Plasma bei Zugabe von Gehirnthrombokinase in 6,0 sec am schnellsten. Thrombokinase, aus Herz gewonnen, ließ das Plasma in 21,29 sec gerinnen. Ähnliche Zeiten wurden auch bei Milz (22,6 sec), Leber (27,2 sec), Niere (20,34 sec), Kiemen (19,53 sec), Haut (26,9 sec) und Schleim (27,71 sec) erzielt. Thrombokinase aus Muskelgewebe brauchte mit 29,08 sec etwas länger, bis sich der erste Fibrinfaden zeigte.

Im Wasserbad von 25⁰ C ließ die Gehirnthrombokinase das Karpfenplasma in 7,86 sec gerinnen. Bei Herzgewebe erhöhte sich die Thromboplastinzeit auf 28,9 sec. Nach 67,7 sec gerann Plasma, mit Milzgewebe zur Reaktion gebracht. Die Thromboplastinzeiten bei den aus Muskulatur, Leber und Haut zeigten mit 51,0 sec bzw. 49,35 sec und 48,89 sec nahe beieinanderliegende Werte. Thrombokinase aus der Niere ließ das Karpfenplasma in 40,62 sec und die aus Kiemengewebe in 25,71 sec gerinnen.

Bei einer Wasserbadtemperatur von 15⁰ C wurde eine Thromboplastinzeit bei Zugabe von Gehirnthrombokinase von 9,32 sec ermittelt. Bei der Zugabe von Thrombokinase aus dem Herzgewebe zeigte sich der erste Fibrinfaden nach 72,13 sec. Die Gerinnungszeiten von Plasma, mit Milzgewebe-, Leber-, Muskel- und Hautgewebe zur Reaktion gebracht, lagen dicht beieinander (Milz 163,33 sec, Leber 152,06 sec, Muskel 153,17 sec, Haut 158,02 sec). Die Thrombokinase aus der Niere und dem Schleim erbrachte Zeiten von 117,17 sec bzw. 122,93 sec. Die Thromboplastinzeit des Karpfenplasmas betrug bei der Hinzugabe von Thrombokinase der Kiemen 52,90 sec.

Eine bessere Übersicht dieser ermittelten Werte zeigt Abb. Nr. 5.

Tab. 2

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) von Gehirn und Herz der Karpfen, die bei 10⁰ C gehältet wurden, und ihre statistische Absicherung

Gehirn TPZ					Statistischer Vergleich
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	15° C	
1 - 4 5 - 8 9 - 12 13 - 16 17 - 20 21 - 24 25 - 27 28 - 30 31 - 35 36 37 - 40	6,60 6,05 6,36 7,00 5,97 6,37 6,00 6,03 5,13 5,23 5,33	1 - 4 5 - 8 9 - 12 13 - 16 17 - 20 21 - 24 25 - 27 28 - 30 31 - 35 36 37 - 40	8,48 8,06 8,00 8,37 7,83 8,60 8,13 7,76 7,87 6,40 6,97	9,08 9,36 9,20 9,20 8,50 9,17 9,20 8,44 8,97 10,90 10,45	
Herz TPZ					37° C - 25° C s _D = 0,4286 t = 14,3522 p < 0,001 37° C - 15° C s _D = 1,1384 t = 9,6409 p < 0,001 25° C - 15° C s _D = 1,2984 t = 3,7156 0,01 > p > 0,001
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	15° C	
1 - 4 5 - 8 9 - 12 13 - 16 17 - 20 21 - 24 25 - 27 28 - 30 31 - 35 36 37 - 40	22,52 24,51 20,20 23,27 17,97 22,97 21,05 18,67 25,10 19,32 18,58	1 - 4 5 - 8 9 - 12 13 - 16 17 - 20 21 - 24 25 - 27 28 - 30 31 - 35 36 37 - 40	26,50 26,56 26,23 26,40 30,27 27,10 25,35 29,56 25,16 34,60 40,90	72,13 71,60 72,10 71,85 70,47 70,45 71,00 69,56 74,34 60,10 45,27	
					37° C - 25° C s _D = 6,7427 t = 3,7772 0,1 > p > 0,001 37° C - 15° C s _D = 7,3713 t = 21,0533 p > 0,001 25° C - 15° C s _D = 13,1141 t = 9,8918 p < 0,001

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) der Milz der Karpfen,
die bei 10⁰ C gehaltet wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37 ⁰ C	Fisch Nr.	25 ⁰ C	Fisch Nr.	15 ⁰ C	Statistischer Vergleich
1	17,64	1	70,46	1	164,40	37 ⁰ - 25 ⁰ C
2	20,08	2	71,20	2	182,60	s _D = 10,4953
3	17,25	3	60,27	3	156,40	t = 26,2574
4	18,90	4	64,10	4	173,50	p < 0,001
5	22,60	5	70,95	5	168,60	
6	23,60	6	68,00	6	166,30	
7	22,25	7	67,27	7	178,90	
8	23,80	8	72,13	8	182,50	
9	23,00	9	71,25	9	176,00	
10	24,20	10	67,00	10	169,00	37 ⁰ - 15 ⁰ C
11	24,73	11	73,60	11	171,20	s _D = 22,3480
12	21,93	12	68,67	12	149,30	t = 39,3004
13	18,55	13	70,40	13	160,50	p < 0,001
14	19,27	14	71,53	14	173,50	
15	17,07	15	71,40	15	163,90	
16	18,67	16	71,13	16	165,40	
17	29,07	17	66,00	17	149,40	
18	17,93	18	69,47	18	158,20	
19	20,13	19	70,60	19	164,00	25 ⁰ - 15 ⁰ C
20	26,73	20	77,27	20	192,20	s _D = 19,8429
21	19,67	21	70,00	21	169,70	t = 31,7638
22	21,67	22	71,73	22	174,80	p < 0,001
23	20,47	23	67,00	23	175,30	
24	20,60	24	72,33	24	170,00	
25	20,76	25	69,67	25	173,10	
26	20,76	26	69,93	26	171,10	
27	20,00	27	68,67	27	173,00	
28	28,25	28	66,95	28	144,10	
29	19,35	29	70,24	29	174,10	
30	20,35	30	69,87	30	158,20	
31	22,50	31	68,30	31	-	
32	26,05	32	61,20	32	171,10	
33	24,47	33	66,20	33	158,20	
34	33,87	34	55,20	34	178,80	
35	28,47	35	61,93	35	181,00	
36	30,40	36	63,60	36	169,90	
37	30,80	37	59,40	37	76,70	
38	21,20	38	63,60	38	109,10	
39	26,20	39	60,80	39	141,90	
40	31,87	40	59,00	40	141,90	

Tab. 4

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) der Niere der Karpfen, die bei 10° C gehäлтert wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C	Statistischer Vergleich
1	17,85	1	37,66	1	119,60	37° C - 25° C s _D = 4,4465 t = 29,1260 p < 0,001
2	18,95	2	41,53	2	117,50	
3	16,35	3	37,60	3	119,40	
4	17,35	4	39,73	4	124,90	
5	21,67	5	40,80	5	122,80	
6	10,35	6	44,07	6	117,40	37° C - 15° C s _D = 17,2465 t = 35,2235 p < 0,001
7	20,40	7	45,33	7	127,10	
8	20,40	8	44,67	8	122,60	
9	19,55	9	40,85	9	128,50	
10	18,47	10	40,87	10	115,80	
11	19,93	11	39,53	11	128,00	25° C = 15° C s _D = 15,8361 t = 30,3360 p < 0,001
12	19,53	12	39,93	12	99,90	
13	18,13	13	37,60	13	116,90	
14	20,20	14	38,67	14	119,00	
15	18,40	15	36,80	15	117,20	
16	19,73	16	38,87	16	116,00	37° C - 25° C s _D = 4,4465 t = 29,1260 p < 0,001
17	25,60	17	33,27	17	119,50	
18	19,20	18	37,93	18	113,90	
19	19,20	19	41,87	19	124,80	
20	26,40	20	52,13	20	140,50	
21	18,40	21	38,60	21	121,50	37° C - 15° C s _D = 15,8361 t = 30,3360 p < 0,001
22	22,80	22	49,20	22	121,50	
23	20,27	23	42,93	23	121,90	
24	20,33	24	46,40	24	121,60	
25	16,76	25	40,00	25	119,60	
26	23,43	26	40,95	26	120,40	37° C - 25° C s _D = 4,4465 t = 29,1260 p < 0,001
27	23,05	27	38,60	27	119,10	
28	25,60	28	42,23	28	135,90	
29	18,27	29	38,40	29	125,90	
30	18,30	30	38,80	30	128,40	
31	19,53	31	45,00	31	-	37° C - 15° C s _D = 15,8361 t = 30,3360 p < 0,001
32	19,50	32	38,93	32	128,50	
33	20,47	33	40,93	33	128,00	
34	19,73	34	37,80	34	132,80	
35	19,93	35	41,50	35	109,50	
36	26,67	36	38,70	36	135,50	37° C - 25° C s _D = 4,4465 t = 29,1260 p < 0,001
37	25,70	37	41,00	37	77,80	
38	24,60	38	41,30	38	92,80	
39	16,30	39	42,10	39	91,30	
40	16,00	40	24,70	40	44,60	

Tab. 5

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) der Leber der Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C	Statistischer Vergleich
1	23,10	1	43,26	1	140,50	37° C - 25° C
2	23,95	2	41,20	2	151,30	$s_D = 9,2276$
3	22,50	3	42,07	3	146,20	$t = 13,9646$
4	27,15	4	41,20	4	149,40	$p < 0,001$
5	32,00	5	52,65	5	154,30	
6	29,85	6	49,73	6	155,30	
7	33,87	7	49,73	7	170,70	
8	33,95	8	51,07	8	157,00	
9	22,85	9	43,95	9	155,40	
10	23,53	10	38,87	10	141,70	
11	23,47	11	48,93	11	155,00	37° C - 15° C
12	23,93	12	43,07	12	135,50	$s_D = 17,8310$
13	23,53	13	44,27	13	147,90	$t = 42,9077$
14	24,93	14	43,80	14	146,20	$p < 0,001$
15	23,53	15	42,93	15	131,60	
16	22,20	16	45,07	16	147,30	
17	31,27	17	44,53	17	167,10	
18	23,80	18	43,73	18	148,10	
19	26,60	19	49,33	19	144,90	
20	31,00	20	59,07	20	166,40	
21	23,00	21	45,68	21	148,90	
22	26,40	22	48,93	22	149,80	25° C - 15° C
23	26,13	23	48,07	23	162,00	$s_D = 18,1114$
24	28,73	24	49,60	24	166,90	$t = 35,7361$
25	21,88	25	44,07	25	146,70	$p < 0,001$
26	23,90	26	44,07	26	134,20	
27	23,00	27	49,53	27	147,40	
28	30,65	28	45,67	28	159,30	
29	22,70	29	37,87	29	169,40	
30	22,65	30	46,07	30	154,00	
31	32,60	31	49,30	31	-	
32	31,70	32	55,67	32	155,70	
33	34,40	33	49,40	33	143,70	
34	67,53	34	85,30	34	197,70	
35	58,93	35	130,70	35	-	
36	29,27	36	47,20	36	171,90	
37	40,90	37	50,00	37	152,00	
38	40,53	38	51,40	38	222,10	
39	23,00	39	36,60	39	95,50	
40	24,20	40	38,40	40	95,00	

Tab. 6

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) der Kiemen der Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C	Statistischer Vergleich
1	17,64	1	22,53	1	54,46	37° C - 25° C
2	16,90	2	24,47	2	56,53	
3	18,05	3	23,67	3	54,54	s _D = 3,4336
4	17,80	4	22,30	4	52,67	
5	19,93	5	24,85	5	54,80	t = 11,6209
6	18,30	6	22,70	6	56,80	
7	19,13	7	26,40	7	57,87	p < 0,001
8	18,95	8	30,00	8	57,93	
9	18,00	9	24,65	9	56,70	
10	17,73	10	22,15	10	50,70	37° C - 15° C
11	19,40	11	24,80	11	58,53	
12	16,73	12	19,87	12	48,27	
13	18,53	13	22,73	13	54,87	s _D = 1,4765
14	19,80	14	25,27	14	55,13	
15	17,07	15	22,93	15	54,60	t = 22,2481
16	17,87	16	25,93	16	54,50	
17	24,20	17	26,20	17	56,33	p < 0,001
18	17,13	18	24,33	18	53,40	
19	18,67	19	24,60	19	53,40	
20	22,60	20	28,13	20	57,53	25° C - 15° C
21	20,33	21	27,14	21	50,47	
22	20,93	22	28,73	22	58,13	
23	18,80	23	26,53	23	58,93	s _D = 9,0898
24	19,67	24	29,60	24	55,67	
25	18,52	25	23,47	25	53,13	t = 18,6446
26	18,96	26	23,13	26	47,10	
27	19,70	27	24,53	27	50,67	p < 0,001
28	24,33	28	27,67	28	61,47	
29	19,05	29	23,85	29	59,10	
30	20,80	30	23,60	30	48,40	
31	18,60	31	28,60	31	-	
32	18,35	32	34,60	32	50,00	
33	18,53	33	24,20	33	49,50	
34	20,95	34	32,13	34	49,30	
35	15,93	35	24,00	35	33,00	
36	18,40	36	22,67	36	48,40	
37	21,20	37	23,07	37	77,45	
38	37,53	38	45,27	38	52,50	
39	20,00	39	17,10	39	28,00	
40	-	40	27,00	40	36,00	

Tab. 7

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) des Muskels der Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C	Statistischer Vergleich
1	30,10	1	44,06	1	150,70	37° C - 25° C
2	29,13	2	47,27	2	168,80	s _D = 11,5597
3	30,25	3	45,73	3	164,90	t = 12,2166
4	28,65	4	41,87	4	146,70	p < 0,001
5	26,47	5	49,60	5	150,90	
6	255,3	6	51,73	6	165,70	
7	22,87	7	47,33	7	164,60	
8	27,10	8	50,13	8	160,70	
9	31,10	9	47,85	9	158,00	
10	25,27	10	43,93	10	147,70	
11	30,73	11	49,21	11	163,60	37° C - 15° C
12	29,40	12	42,87	12	141,50	s _D = 21,3044
13	31,00	13	47,00	13	154,00	t = 29,0490
14	31,00	14	48,00	14	154,00	p < 0,001
15	29,20	15	46,40	15	147,80	
16	30,40	16	44,93	16	145,00	
17	32,60	17	45,00	17	165,00	
18	29,53	18	45,20	18	144,80	
19	26,73	19	49,23	19	146,70	
20	37,20	20	60,80	20	-	
21	25,47	21	52,12	21	151,70	25° C - 15° C
22	27,07	22	54,40	22	162,00	s _D = 16,0995
23	23,33	23	48,67	23	164,10	t = 46,7832
24	27,20	24	49,20	24	160,30	p < 0,001
25	28,04	25	47,07	25	152,10	
26	25,48	26	47,80	26	160,20	
27	25,05	27	49,00	27	172,90	
28	32,55	28	49,40	28	155,60	
29	25,55	29	46,33	29	166,30	
30	27,55	30	45,87	30	160,40	
31	26,47	31	50,07	31	-	
32	30,90	32	44,00	32	141,70	
33	26,47	33	51,80	33	153,00	
34	19,33	34	45,80	34	-	
35	32,13	35	75,50	35	118,00	
36	44,30	36	123,40	36	137,70	
37	35,50	37	46,07	37	122,90	
38	52,60	38	-	38	-	
39	23,50	39	52,30	39	138,20	
40	19,20	40	60,90	40	188,20	

Tab. 8

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) der Haut der Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C	Statistischer Vergleich
1	23,23	1	45,33	1	170,40	37° C - 25° C
2	21,60	2	45,80	2	163,10	
3	22,15	3	44,40	3	170,60	s _D = 8,4976
4	21,80	4	49,20	4	163,80	
5	34,40	5	46,00	5	174,10	t = 16,3586
6	33,90	6	46,67	6	127,20	
7	35,47	7	44,73	7	174,90	p < 0,001
8	35,85	8	50,40	8	173,40	
9	20,95	9	46,00	9	-	
10	20,83	10	45,13	10	166,60	
11	23,00	11	45,60	11	171,50	37° C - 15° C
12	20,40	12	46,20	12	158,50	
13	23,07	13	44,73	13	168,10	s _D = 25,2154
14	24,27	14	47,87	14	171,90	
15	23,13	15	45,00	15	173,10	t = 32,3176
16	23,27	16	45,27	16	171,30	
17	28,47	17	51,13	17	174,90	p < 0,001
18	22,53	18	46,00	18	172,10	
19	31,40	19	51,20	19	145,70	
20	24,80	20	69,00	20	155,50	
21	22,27	21	48,20	21	153,70	25° C - 15° C
22	32,80	22	51,20	22	133,55	
23	33,40	23	43,93	23	177,50	s _D = 27,2315
24	31,53	24	52,80	24	171,70	
25	20,88	25	44,73	25	164,50	t = 24,6890
26	22,13	26	44,27	26	202,30	
27	23,40	27	45,67	27	214,30	p < 0,001
28	29,00	28	51,87	28	165,80	
29	26,40	29	45,27	29	172,20	
30	21,00	30	46,47	30	152,50	
31	33,53	31	47,13	31	-	
32	32,40	32	48,93	32	154,40	
33	33,47	33	50,40	33	151,20	
34	45,13	34	79,40	34	125,10	
35	31,67	35	74,20	35	130,00	
36	21,73	36	65,60	36	137,20	
37	24,60	37	30,67	37	123,80	
38	24,67	38	33,33	38	139,60	
39	25,10	39	51,30	39	101,60	
40	26,30	40	44,50	40	99,20	

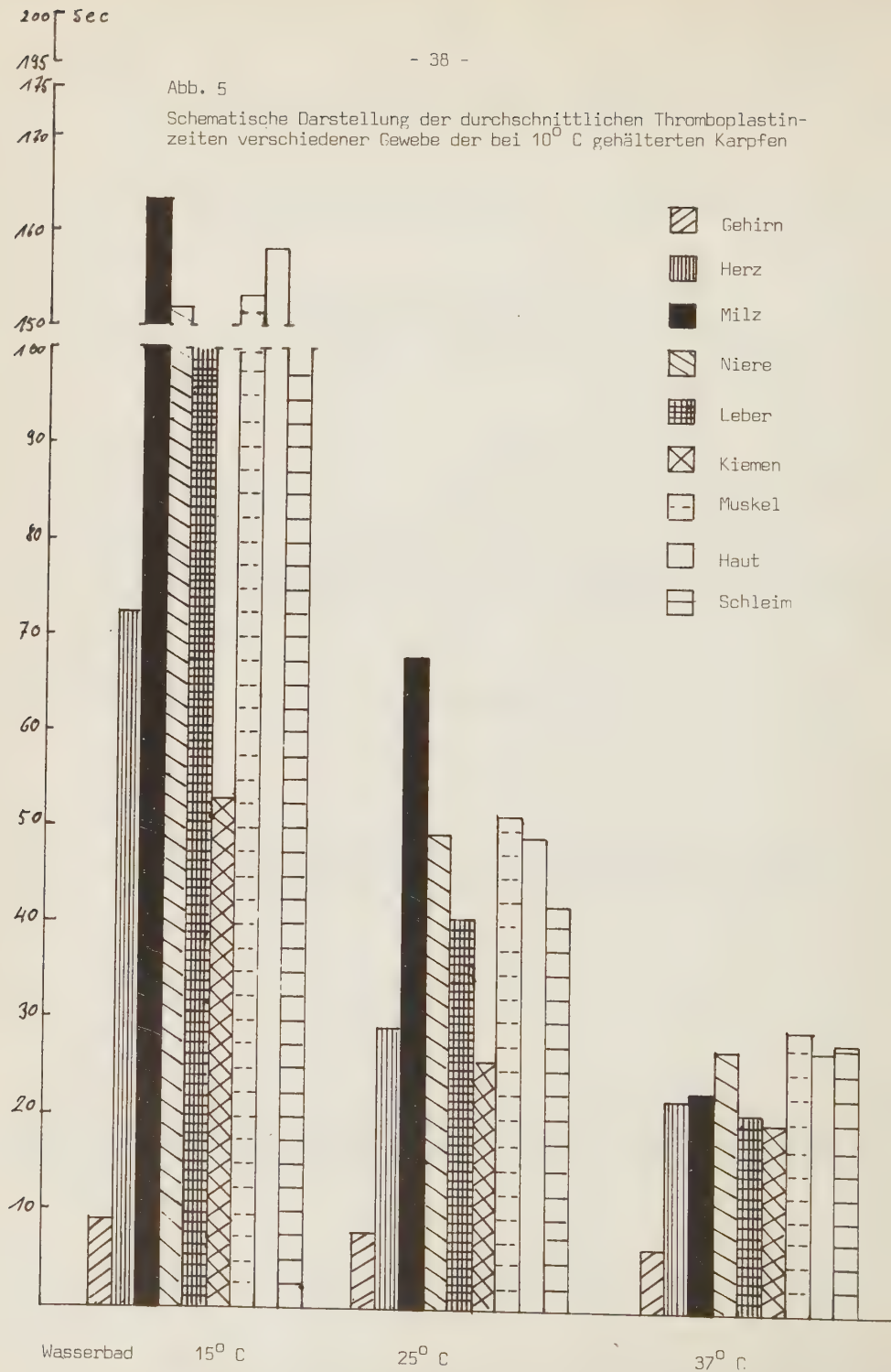
Tab. 9

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) des Schleims der Karpfen, die bei 10⁰ C gehältet wurden, und ihre statistische Absicherung

Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C	Statistischer Vergleich
1	23,66	1	37,00	1	117,00	37° - 25° C
2	23,70	2	37,66	2	133,50	S _D = 14,0296
3	22,15	3	38,67	3	119,50	t = 6,1387
4	21,90	4	36,00	4	121,10	p < 0,001
5	28,20	5	35,80	5	120,40	
6	27,60	6	37,87	6	118,00	
7	30,27	7	39,47	7	119,50	
8	24,65	8	38,93	8	127,40	
9	22,35	9	38,20	9	126,90	
10	21,90	10	36,15	10	120,00	
11	25,07	11	37,13	11	137,40	37° - 15° C
12	23,00	12	33,80	12	119,20	S _D = 18,3965
13	23,40	13	38,07	13	116,70	t = 31,7941
14	26,00	14	38,80	14	122,50	p < 0,001
15	22,80	15	36,80	15	121,40	
16	24,47	16	36,60	16	118,50	
17	26,87	17	37,53	17	132,00	
18	26,07	18	38,53	18	122,50	
19	31,07	19	38,73	19	115,10	
20	28,73	20	54,00	20	136,50	
21	23,60	21	36,00	21	115,60	25° - 15° C
22	28,80	22	40,93	22	120,00	S _D = 21,1160
23	27,93	23	38,13	23	124,50	t = 23,5856
24	25,80	24	40,80	24	120,50	p < 0,001
25	23,70	25	36,67	25	128,60	
26	26,20	26	34,67	26	83,40	
27	24,55	27	35,67	27	90,87	
28	27,73	28	37,67	28	137,20	
29	23,10	29	37,55	29	100,53	
30	24,00	30	37,40	30	116,50	
31	24,93	31	37,33	31	-	
32	27,75	32	41,00	32	125,20	
33	27,20	33	40,53	33	123,13	
34	43,43	34	136,50	34	156,40	
35	86,13	35	91,90	35	154,50	
36	-	36	-	36	-	
37	24,50	37	30,73	37	139,50	
38	34,80	38	40,73	38	120,90	
39	14,30	39	25,40	39	49,10	
40	30,30	40	34,10	40	182,70	

Abb. 5

Schematische Darstellung der durchschnittlichen Thromboplastinzeiten verschiedener Gewebe der bei 10° C gehärteten Karpfen



2. Thromboplastinzeit der Karpfen, die bei 25° C gehäлтert wurden

Die Versuchsanordnung und -durchführung bei den bei 25° C gehäлтerten Karpfen waren die gleichen wie bei den Karpfen, die bei 10° C gehäлтert wurden.

In den Tabellen 10 - 14 sind die ermittelten Werte dargestellt.

Im Wasserbad von 37° C gerann das Karpfenplasma bei Zugabe von Gehirnthrombokinasе in 6,31 sec, bei Zugabe von Thrombokinasе aus dem Herzgewebe in 24,37 sec. Milz- und Leberthrombokinasе brauchten für diesen Vorgang 41,34 sec. bzw. 59,21 sec. Die Thromboplastinzeit unter Zugabe von Nierengewebe betrug 39,19 sec, mit Kiementhrombokinasе zusammengebracht, gerann das Plasma in 28,12 sec. Muskel- und Schleimgewebe erbrachten eine Thromboplastinzeit von 32,98 bzw. 32,15 sec. Bei Hautgewebe zeigte sich der erste Fibrinfaden nach 18,15 sec.

Im Wasserbad von 25° C betrug die Thromboplastinzeit bei Zugabe von Gehirnthrombokinasе 8,35 sec, bei Zugabe von Herzthrombokinasе 26,2 sec. Die Thrombokinasen, die aus der Haut bzw. den Kiemen gewonnen wurden, ließen das Plasma in 34,95 sec bzw. 34,63 sec gerinnen, bei Thrombokinasе aus dem Nierengewebe trat der erste Fibrinfaden nach 54,29 sec, bei der aus dem Muskelgewebe nach 55,29 sec auf. Schleim- und Milzthrombokinasе ließen das Plasma nach 64,56 sec bzw. 67,48 sec gerinnen. Bei der Zugabe von Thrombokinasе aus dem Lebergewebe gerann das Karpfenplasma nach 95,21 sec.

Die Thromboplastinzeit zeigte bei einer Wasserbadtemperatur von 15° C nach Zugabe von Gehirnthrombokinasе einen Wert von 13,28 sec, nach Zugabe von Thrombokinasе aus Herzgewebe 75,63 sec. Hautthrombokinasе ließ Karpfenplasma in 49,57 sec gerinnen, Thrombokinasе aus Kiementgewebe gewonnen, in 61,29 sec. Bei der Zugabe von Muskelthrombokinasе bildete sich der erste Fibrinfaden nach 79,69 sec. Bei der Thrombokinasе aus der Niere betrug die Thromboplastinzeit 155,69, bei der aus dem Lebergewebe 194,1 sec. Mit Milz- und Schleimthrombokinasе zeigte das Plasma keine Gerinnung.

Tab. 10

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) von Gehirn und Herz der Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

G e h i r n TPZ					Statistischer Vergleich
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
1 - 4	6,65	1 - 4	8,63	1 - 4	37° C - 25° C s _D = 0,0827 t = 49,2355 p < 0,001
5 - 6	6,43	5 - 6	8,40	5 - 6	
7 - 8	6,40	7 - 8	8,55	7 - 8	
9 - 10	5,76	9 - 10	7,80	9 - 10	
					37° C - 15° C s _D = 0,2394 t = 58,2603 p < 0,001
					25° C - 15° C s _D = 0,1599 t = 61,7690 p < 0,001
H e r z TPZ					Statistischer Vergleich
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
1 - 2	26,93	1 - 2	27,67	1 - 2	37° C - 25° C s _D = 2,0928 t = 1,9723 0,2 > p > 0,1
3 - 4	25,40	3 - 4	28,00	3 - 4	
5 - 6	26,70	5 - 6	28,73	5 - 6	
7 - 8	28,60	7 - 8	27,73	7 - 8	
9 - 10	14,20	9 - 10	18,93	9 - 10	37° C - 15° C s _D = 21,7731 t = 4,2373 0,02 > p > 0,01
					25° C - 15° C s _D = 0,7644 t = 0,3419 p < 0,001

Tab. 11

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) von Milz und Leber der Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

M i l z TPZ					Statistischer Vergleich
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
1	36,40	1	59,9	1	-
2	36,10	2	68,6	2	-
3	38,80	3	65,3	3	-
4	41,00	4	67,0	4	-
5	68,50	5	95,5	5	-
6	40,50	6	65,3	6	-
7	37,70	7	63,5	7	-
8	38,40	8	63,6	8	-
9	37,30	9	63,0	9	-
10	38,70	10	63,1	10	-
					$s_D = 2,3030$ $t = 36,1397$ $p < 0,001$
L e b e r TPZ					Statistischer Vergleich
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
1	53,60	1	109,9	1	195,5
2	47,70	2	89,8	2	191,4
3	70,80	3	95,8	3	195,5
4	60,20	4	97,6	4	201,2
5	62,10	5	96,5	5	194,3
6	63,10	6	96,0	6	190,3
7	57,40	7	94,8	7	186,3
8	64,40	8	97,3	8	203,7
9	57,70	9	91,6	9	190,0
10	55,10	10	89,8	10	192,8
					$s_D = 8,1553$ $t = 14,2380$ $p < 0,001$
					$s_D = 6,7018$ $t = 63,6484$ $p < 0,001$
					$s_D = 6,2507$ $t = 49,6704$ $p < 0,001$

Tab. 12

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) von Niere und Kiemen der Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

N i e r e TPZ					Statistischer Vergleich 37° C - 25° C
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
1	38,40	1	55,5	1	156,3
2	45,20	2	58,2	2	151,7
3	38,10	3	54,8	3	159,6
4	35,00	4	53,4	4	155,8
5	46,60	5	60,2	5	161,2
6	46,00	6	54,0	6	159,2
7	43,40	7	55,9	7	164,2
8	38,20	8	51,7	8	153,5
9	31,00	9	50,1	9	147,8
10	30,00	10	49,1	10	147,6
					$s_D = 4,4468$ $t = 82,1092$ $p < 0,001$
					$s_D = 5,2137$ $t = 76,0976$ $p < 0,001$
K i e m e n TPZ					37° C - 25° C
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C
1	28,20	1	30,5	1	65,0
2	26,70	2	35,0	2	63,0
3	28,90	3	35,9	3	66,1
4	33,50	4	38,0	4	62,7
5	27,50	5	36,7	5	62,8
6	25,40	6	35,6	6	59,3
7	40,10	7	43,3	7	65,3
8	24,90	8	35,3	8	57,0
9	25,10	9	34,4	9	55,0
10	26,90	10	27,3	10	56,6
					$s_D = 3,0850$ $t = 7,6673$ $p < 0,001$
					$s_D = 3,9962$ $t = 25,7656$ $p < 0,001$
					$s_D = 4,7253$ $t = 16,7841$ $p < 0,001$

Tab. 13

Errechnet Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) von Muskel und Haut der Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden, und ihre statistische Absicherung

M u s k e l TPZ					Statistischer Vergleich
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
				15° C	
1	35,5	1	57,5	1	37° C - 25° C s _D = 8,9273 t = 9,8758 p < 0,001
2	28,9	2	76,3	2	
3	30,9	3	60,9	3	
4	30,1	4	61,1	4	
5	29,2	5	60,9	5	37° C - 15° C s _D = 3,9509 t = 37,3386 p < 0,001
6	32,9	6	58,2	6	
7	28,8	7	59,3	7	
8	32,3	8	56,8	8	
9	49,1	9	62,6	9	25° C - 15° C s _D = 7,4798 t = 7,8848 p < 0,001
10	33,1	10	56,8	10	
H a u t TPZ					37° C - 25° C
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	
				15° C	
1	19,8	1	32,7	1	s _D = 9,2012 t = 4,9834 p < 0,001
2	18,8	2	59,2	2	
3	19,8	3	32,1	3	
4	17,3	4	30,1	4	
5	21,0	5	31,7	5	37° C - 15° C s _D = 6,9802 t = 13,3374 p < 0,001
6	21,1	6	32,6	6	
7	18,3	7	30,2	7	
8	21,6	8	33,8	8	
9	21,6	9	32,0	9	25° C - 15° C s _D = 7,5182 t = 6,2840 p < 0,001
10	23,1	10	31,9	10	

Tab. 14

Errechnete Mittelwerte der Thromboplastinzeit (TPZ) vom Schleim der Karpfen, die bei 25° C gehäutert wurden, und ihre statistische Absicherung

S c h l e i m TPZ					
Fisch Nr.	37° C	Fisch Nr.	25° C	Fisch Nr.	15° C
1	42,7	1	92,0	1	-
2	42,2	2	85,3	2	-
3	23,2	3	36,3	3	-
4	13,27	4	25,4	4	-
5	39,4	5	83,8	5	-

Statistischer Vergleich

37° C - 25° C

$s_D = 18,4291$

$t = 3,9538$

$0,02 > p > 0,01$

Abb. 6

Schematische Darstellung der durchschnittlichen Thromboplastinzeiten verschiedener Gewebe der bei 25° C gehälterten Karpfen

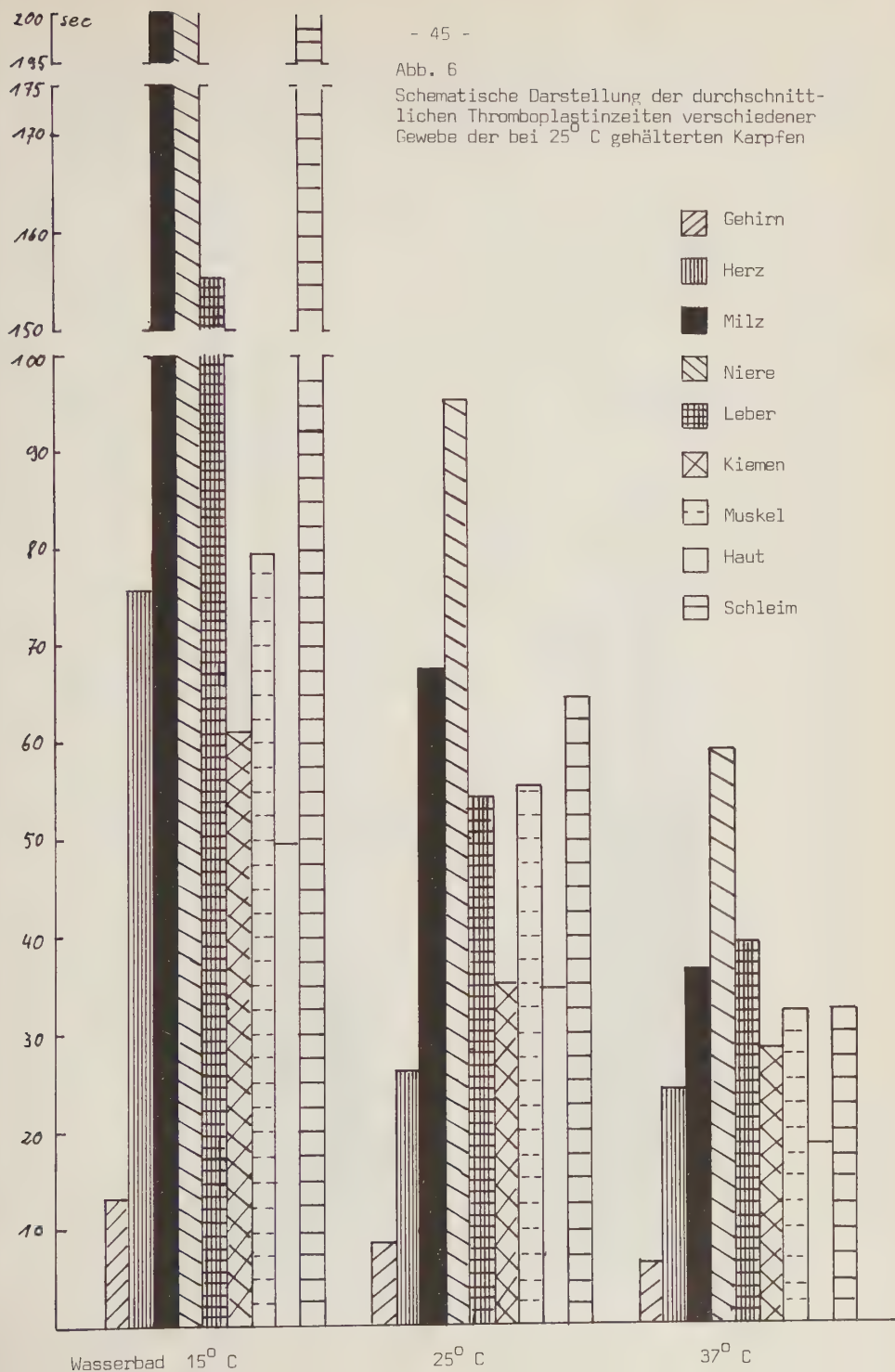


Abb. 7

Schematische Gegenüberstellung der Thromboplastinzeiten verschiedener Gewebe der Karpfen des Kalt- und Warmwasserversuches (10°C , 25°C) bei einer Wasserbadtemperatur von 37°C

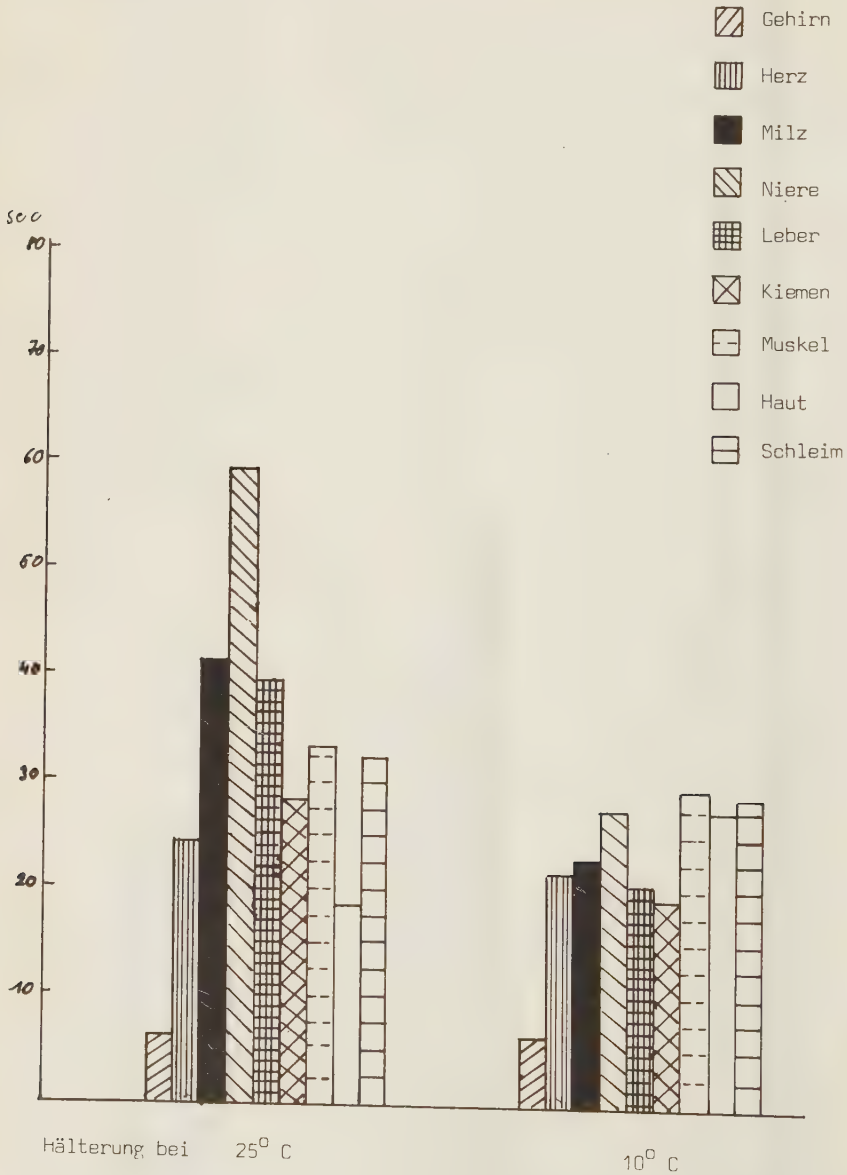
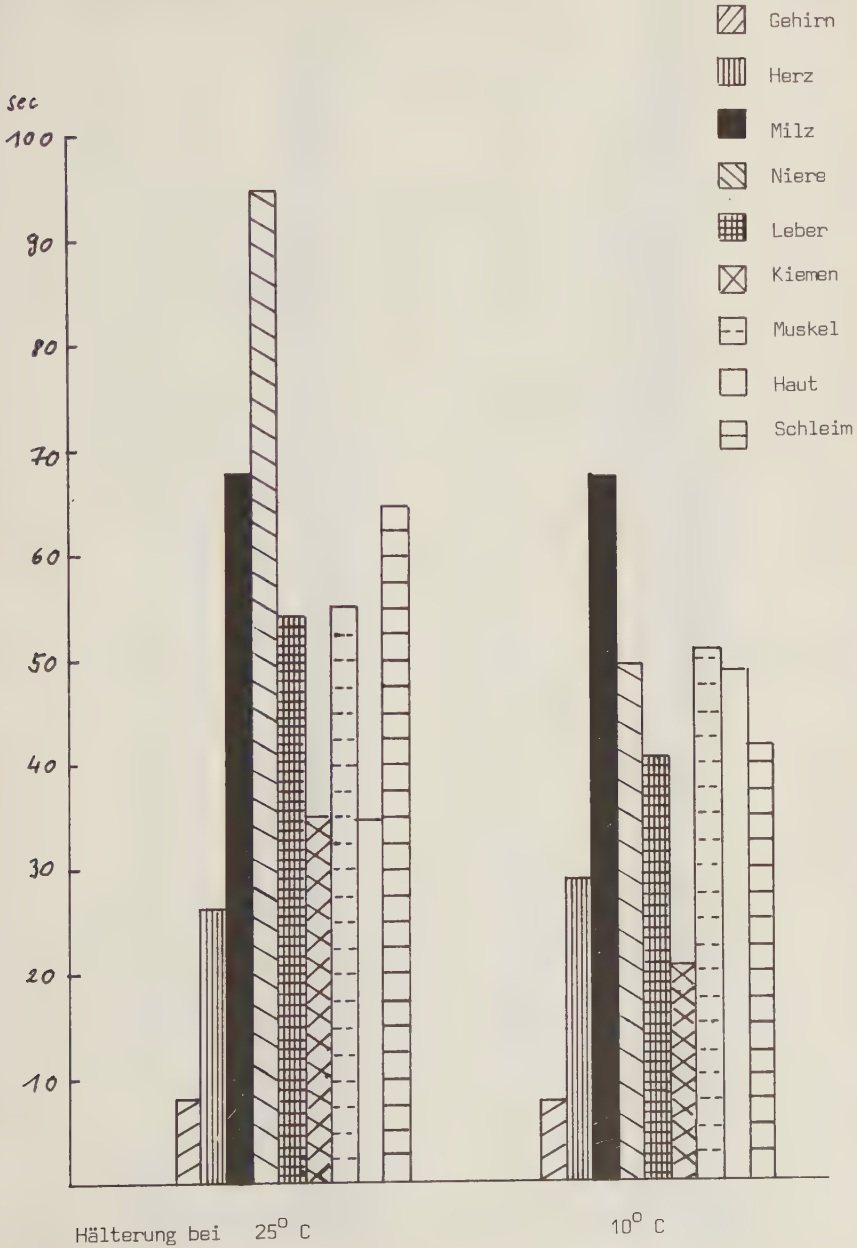
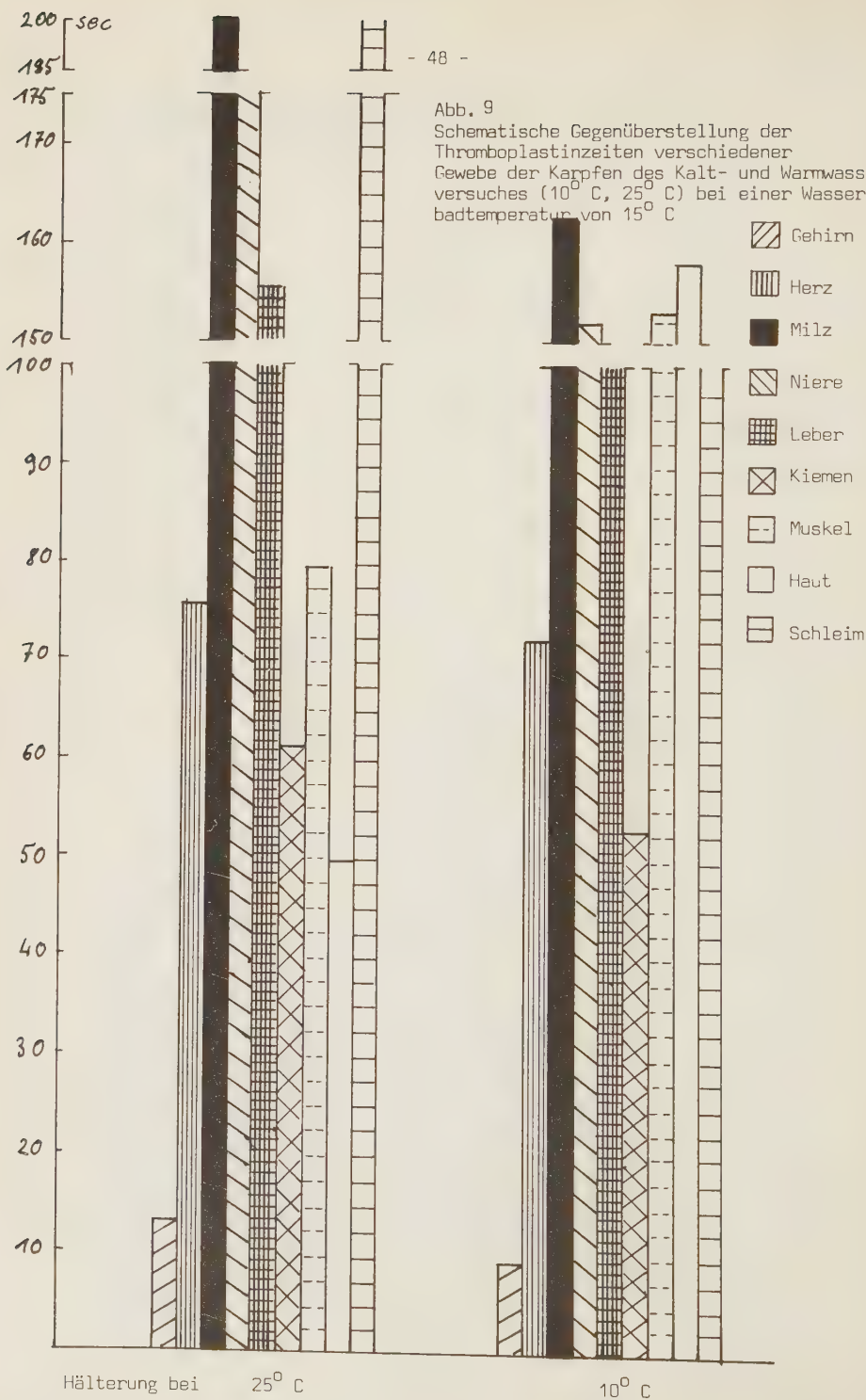


Abb. 8

Schematische Gegenüberstellung der Thromboplastinzeiten verschiedener Gewebe der Karpfen des Kalt- und Warmwasserversuches (10°C , 25°C) bei einer Wasserbadtemperatur von 25°C





3. Fibrinogengehalt der Karpfenplasmen des Kalt- und Warmwasser-versuches

Eine gleichzeitige Bestimmung des Fibrinogengehaltes nach Biuret ergab im Plasma der bei 10⁰ C gehälterten Karpfen mit einem durchschnittlichen Wert von 1,43 g % (1,13 g % - 1,81 g %) eine Übereinstimmung mit Fleming.

Ähnliche Werte lieferten die bei 25⁰ C gehälterten Fische. Mit einem durchschnittlichen Plasma-Fibrinogengehalt von 1,68 g % (1,24 g % - 1,86 g %) weichen sie von der anderen Versuchsreihe kaum ab (siehe die folgenden Tabellen Nr. 15 und 16).

4. Statistische Berechnung der gemessenen Werte und Auswertung

Statistisch verglichen und abgesichert wurden alle gemessenen Thromboplastinzeiten mit Hilfe des t-Testes bei Paar-Analysen und des t-Testes bei nicht gepaarten Daten.

t-Test bei Paar-Analysen

An Hand eines Beispieles soll dieser Test genau erklärt werden. Die Daten für die anderen Gewebe sind entsprechend und den Tabellen zu entnehmen, in denen aus Platzgründen nicht alle ermittelten Zwischenergebnisse untergebracht werden konnten. Deshalb werden alle ermittelten statistischen Daten weiter unten noch einmal ausführlicher aufgeführt.

Fisch Nr.	Fibrinogengehalt	Fisch Nr.	Fibrinogengehalt
1	1,50 g %	21	1,81 g %
2	1,32 g %	22	1,57 g %
3	1,31 g %	23	1,65 g %
4	1,20 g %	24	1,17 g %
5	1,61 g %	25	1,56 g %
6	1,62 g %	26	1,71 g %
7	1,36 g %	27	1,62 g %
8	1,41 g %	28	1,52 g %
9	1,33 g %	29	1,39 g %
10	1,49 g %	30	1,46 g %
11	1,38 g %	31	1,21 g %
12	1,50 g %	32	1,44 g %
13	1,52 g %	33	1,42 g %
14	1,37 g %	34	1,64 g %
15	1,64 g %	35	1,29 g %
16	1,62 g %	36	1,13 g %
17	1,54 g %	37	1,20 g %
18	1,56 g %	38	1,42 g %
19	1,71 g %	39	1,59 g %
20	1,58 g %	40	1,42 g %

Tab. 15
Plasmafibrinogengehalt der Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden (Mittelwerte)

Fischplasma Nr.	Fibrinogengehalt
1	1,48 g %
2	1,41 g %
3	1,33 g %
4	1,72 g %
5	1,86 g %
6	1,50 g %
7	1,58 g %
8	1,24 g %
9	1,53 g %
10	1,62 g %

Tab. 16
Plasmafibrinogengehalt der Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden

Der Test sollte beweisen, ob die Temperaturunterschiede des Wasserbades die Gerinnungszeiten signifikant ($p < 0,02$) beeinflussen oder nicht. Verglichen wurden die Thromboplastinzeiten (TPZ) bei 37°C mit denen bei 25°C und denen bei 15°C , sowie die Thromboplastinzeiten bei 25°C mit denen bei 15°C .

Dabei verglich man die Thromboplastinzeiten, die bei den bei 10°C gehälterten Karpfen gemessen wurden und die, die man bei den bei 25°C gehälterten Karpfen erhielt, gesondert.

Als Beispiel seien die Thromboplastinzeiten des Gehirns der bei 10°C gehälterten Karpfen genommen.

Beide Gruppen unterscheiden sich nur in bezug auf den interessierenden Parameter.

Es seien

$\bar{x}_D$ der Mittelwert der Differenzen zwischen den einzelnen Anteilen des Paares

s_D die Standardabweichung der Differenzen

$s_{\bar{x}_D}$ die geschätzte Streuung des Mittelwertes der Differenzen

$$t = \frac{\bar{x}_D}{s_{\bar{x}_D}}$$

Der Wert p , d. h. die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Eintreffens der Resultate, wird aus einer Tabelle entnommen.

Vergleich der Gehirn TPZ bei einer Wasserbadtemperatur von 37°C mit der bei einer Wasserbadtemperatur von 25°C

$37^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ Wasserbadtemperatur

$$\bar{x}_D = 1,8545$$

$$s_D = 0,4286$$

$$s_{\bar{x}_D} = 0,1292$$

$$t = 14,3522 \quad p < 0,001$$

Gehirn-TPZ $37^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}$ Wasserbadtemperatur

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 3,3091 \\ s_D &= 1,1384 \\ s_{\bar{x}_D} &= 0,3432 \\ t &= 9,6409 \quad p < 0,001\end{aligned}$$

Gehirn-TPZ $25^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}$ Wasserbadtemperatur

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 1,4545 \\ s_D &= 1,2984 \\ s_{\bar{x}_D} &= 0,3915 \\ t &= 3,7156 \quad 0,01 > p > 0,001\end{aligned}$$

Bei den ersten beiden Vergleichen ($37^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$ und $37^{\circ}\text{C} - 15^{\circ}\text{C}$) war "p" kleiner als 0,001, d. h., die Wahrscheinlichkeit, daß die Resultate zufällig bedingt sind, beträgt weniger als 0,1 %. Sie sind somit hoch signifikant. Beim Vergleich der Messungen bei 25°C zu denen bei 15°C ergab sich eine Wahrscheinlichkeitsrate von 1 %. Man kann hier ebenfalls von einer Signifikanz sprechen.

Statistische Daten des Kaltwasserversuches (10°C)

Vergleich der einzelnen Wasserbadtemperaturen

Gehirn-TPZ $37^{\circ} - 25^{\circ}\text{C}$	$37^{\circ} - 15^{\circ}\text{C}$	$25^{\circ} - 15^{\circ}\text{C}$
$\bar{x}_D = 1,8545$	$\bar{x}_D = 3,3091$	$\bar{x}_D = 1,4545$
$s_D = 0,4286$	$s_D = 1,1384$	$s_D = 1,2984$
$s_{\bar{x}_D} = 0,1292$	$s_{\bar{x}_D} = 0,3432$	$s_{\bar{x}_D} = 0,3915$
$t = 14,3522$	$t = 9,6409$	$t = 3,7156$
$p < 0,001$	$p < 0,001$	$0,01 > p > 0,001$

Herz-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 7,6791 \\ s_D &= 6,7427 \\ s_{x_D}^- &= 2,0330 \\ t &= 3,7772 \\ p &> 0,001\end{aligned}$$

37° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 46,7918 \\ s_D &= 7,3713 \\ s_{x_D}^- &= 2,2225 \\ t &= 21,0533 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 39,1127 \\ s_D &= 13,1141 \\ s_{x_D}^- &= 3,9541 \\ t &= 9,8918 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

Milz-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 43,5728 \\ s_D &= 10,4953 \\ s_{x_D}^- &= 1,6594 \\ t &= 26,2574 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

37° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 140,6382 \\ s_D &= 22,3480 \\ s_{x_D}^- &= 3,5785 \\ t &= 39,3004 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 95,8405 \\ s_D &= 18,829 \\ s_{x_D}^- &= 3,0173 \\ t &= 31,7638 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

Nieren-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 20,4776 \\ s_D &= 4,4465 \\ s_{x_D}^- &= 6,7030 \\ t &= 29,1260 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

37° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 97,2751 \\ s_D &= 17,2465 \\ s_{x_D}^- &= 2,7617 \\ t &= 35,2235 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 76,9262 \\ s_D &= 15,8361 \\ s_{x_D}^- &= 2,5358 \\ t &= 30,3360 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

Leber-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 20,3745 \\ s_D &= 9,2276 \\ s_{x_D}^- &= 1,4590 \\ t &= 13,9646 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

37° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 124,1137 \\ s_D &= 17,831_0 \\ s_{x_D}^- &= 2,8926 \\ t &= 42,9077 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 104,9950 \\ s_D &= 18,1114 \\ s_{x_D}^- &= 2,9381 \\ t &= 35,7361 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

Kiemel-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 6,3090 \\ s_D &= 3,4336 \\ s_{x_D}^- &= 0,5429 \\ t &= 11,6209 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 32,8492 \\ s_D &= 9,2207 \\ s_{x_D}^- &= 1,4765 \\ t &= 22,2481 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 27,1377 \\ s_D &= 9,0898 \\ s_{x_D}^- &= 1,4555 \\ t &= 18,6446 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

Muskel-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 22,6133 \\ s_D &= 11,5597 \\ s_{x_D}^- &= 1,8510 \\ t &= 12,2166 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 103,1453 \\ s_D &= 21,3044 \\ s_{x_D}^- &= 3,5507 \\ t &= 29,0490 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 125,5311 \\ s_D &= 16,0995 \\ s_{x_D}^- &= 2,6833 \\ t &= 46,7832 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

Haut-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 21,9793 \\ s_D &= 8,4976 \\ s_{x_D}^- &= 1,3436 \\ t &= 16,3586 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 132,1947 \\ s_D &= 25,2154 \\ s_{x_D}^- &= 4,0905 \\ t &= 32,3176 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 109,0645 \\ s_D &= 27,2315 \\ s_{x_D}^- &= 4,4175 \\ t &= 24,6890 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

Schleim-TPZ 37° - 25° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 13,7908 \\ s_D &= 14,0296 \\ s_{x_D}^- &= 2,2465 \\ t &= 6,1387 \\ p &< 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 94,8832 \\ s_D &= 18,3965 \\ s_{x_D}^- &= 2,9843 \\ t &= 31,7941 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

25° - 15° C

$$\begin{aligned}\bar{x}_D &= 80,7916 \\ s_D &= 21,1160 \\ s_{x_D}^- &= 3,4255 \\ t &= 23,5856 \\ p &= 0,001\end{aligned}$$

Statistische Daten des Warmwasserversuches (25° C)

Vergleich der einzelnen Wasserbadtemperaturen

(37° zu 25° C, 37° C zu 15° C, 25° C zu 15° C)

t-Test bei den Fischen, die bei 25° C gehältert wurden

<u>Gehirn-TPZ</u>	37° C - 25° C	37° - 15° C	25° - 15° C
$\bar{x}_D$	= 2,0350	$\bar{x}_D$ = 6,9725	$\bar{x}_D$ = 4,9375
s_D	= 0,0827	s_D = 0,2394	s_D = 0,1599
$s_{\bar{x}_D}$	= 0,0413	$s_{\bar{x}_D}$ = 0,1197	$s_{\bar{x}_D}$ = 0,0799
t	= 49,2355	t = 58,2603	t = 61,7690
p	< 0,001	p < 0,001	p < 0,001

<u>Herz-TPZ</u>	37° - 25° C	37° - 15° C	25° - 15° C
$\bar{x}_D$	= 1,8460	$\bar{x}_D$ = 41,2600	$\bar{x}_D$ = 49,4140
s_D	= 2,0928	s_D = 21,7731	s_D = 0,7644
$s_{\bar{x}_D}$	= 0,9359	$s_{\bar{x}_D}$ = 9,7373	$s_{\bar{x}_D}$ = 0,3419
t	= 1,9723	t = 4,2373	t = 44,5459
	0,2 > p > 0,1	0,02 > p > 0,01	p < 0,001

<u>Milz-TPZ</u>	37° - 25° C	<u>Schleim</u>	37° - 25° C
$\bar{x}_D$	= 26,3200	$\bar{x}_D$	= 32,5860
s_D	= 2,3030	s_D	= 18,4291
$s_{\bar{x}_D}$	= 0,7283	$s_{\bar{x}_D}$	= 8,2417
t	= 36,1397	t	= 3,9538
p	< 0,001		0,02 > p > 0,01

<u>Nieren-TPZ</u>	$37^{\circ} - 25^{\circ} \text{ C}$	$37^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$	$25^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$
$\bar{x}_D$	= 15,1000	$\bar{x}_D$ = 116,500	$\bar{x}_D$ = 101,4000
s_D	= 3,5876	s_D = 4,4868	s_D = 4,2137
$s_{x_D}^-$	= 1,1345	$s_{x_D}^-$ = 1,4188	$s_{x_D}^-$ = 1,3325
t	= 13,3087	t = 82,1092	t = 76,0976
p	< 0,001	p < 0,001	p < 0,001

<u>Leber-TPZ</u>	$37^{\circ} - 25^{\circ} \text{ C}$	$37^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$	$25^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$
$\bar{x}_D$	= 36,7100	$\bar{x}_D$ = 134,8900	$\bar{x}_D$ = 98,1800
s_D	= 8,1533	s_D = 6,7018	s_D = 6,2507
$s_{x_D}^-$	= 2,5783	$s_{x_D}^-$ = 2,1193	$s_{x_D}^-$ = 1,9766
t	= 14,2380	t = 63,6484	t = 49,6704
p	< 0,001	p < 0,001	p < 0,001

<u>Kiemen-TPZ</u>	$37^{\circ} - 25^{\circ} \text{ C}$	$37^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$	$25^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$
$\bar{x}_D$	= 7,4800	$\bar{x}_D$ = 32,5600	$\bar{x}_D$ = 25,0800
s_D	= 3,0850	s_D = 3,9962	s_D = 4,7253
$s_{x_D}^-$	= 0,9756	$s_{x_D}^-$ = 1,2637	$s_{x_D}^-$ = 1,4943
t	= 7,6673	t = 25,7656	t = 16,7841
p	< 0,001	p < 0,001	p < 0,001

<u>Muskel-TPZ</u>	$37^{\circ} - 25^{\circ} \text{ C}$	$37^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$	$25^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$
$\bar{x}_D$	= 27,8800	$\bar{x}_D$ = 46,6500	$\bar{x}_D$ = 18,6500
s_D	= 8,9273	s_D = 3,9509	s_D = 7,4798
$s_{x_D}^-$	= 2,8231	$s_{x_D}^-$ = 1,2494	$s_{x_D}^-$ = 2,3653
t	= 9,8758	t = 37,3386	t = 7,8848
p	< 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Haut-TPZ	37° - 25° C	37° - 25° C	25° C - 15° C
$\bar{x}_D$	= 14,5000	$\bar{x}_D$ = 29,4400	$\bar{x}_D$ = 14,9400
s_D	= 9,2012	s_D = 6,9802	s_D = 7,5182
$s_{x_D}^2$	= 2,9097	$s_{x_D}^2$ = 2,2073	$s_{x_D}^2$ = 2,3774
t	= 4,9834	t = 13,3374	t = 6,2840
p	< 0,001	p < 0,001	p < 0,001

t-Test bei nicht gepaarten Daten

Dieser Test sollte nur zeigen, ob die unterschiedliche Temperatur (10° C und 25° C) bei der Hälterung der Karpfen eine signifikante Rolle spielte oder nicht. Verglichen wurden die einzelnen Thromboplastinzeiten, die die bei 10° C gehälterten Karpfen lieferten, mit denen, die die bei 25° C gehälterten Tiere erbrachten. Verglichen werden konnten natürlich nur die Werte, die man bei der gleichen Wasserbadtemperatur, also jeweils bei 37° C oder 25° C oder bei 15° C erhielt.

Als Beispiel seien wiederum die Thromboplastinzeiten des Gehirns genommen (siehe Tabellen).

Dabei seien

$$s_1 = s_2 \quad \text{die Schätzung der Standardabweichung beider Kollektive}$$

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{s_{x_1}^2 - s_{x_2}^2}}$$

d. h. das arithmetische Mittel des Kollektivs 2 minus dem arithmetischen Mittel des Kollektivs 1 geteilt durch die Streuung der Differenz der arithmetischen Mittel.

Gehirn-TPZ bei 37° C Wasserbadtemperatur

$$s_1 - s_2 = 0,5456$$

$$t = 0,9532 \quad 0,4 > p > 0,3$$

Gehirn-TPZ bei 25° C Wasserbadtemperatur

$$s_1 - s_2 = 0,5980$$

$$t = 1,3148 \quad 0,3 > p > 0,2$$

Gehirn-TPZ bei 15° C Wasserbadtemperatur

$$s_1 - s_2 = 0,7241$$

$$t = 9,3124 \quad p < 0,001$$

Mit einem Wahrscheinlichkeitsgrad von über 30 % sind die Werte bei 37° C nicht signifikant, ebenso nicht bei 25° C mit über 20 %.

Dagegen kann man bei 15° C mit 0,1 % Wahrscheinlichkeit von einer hohen Signifikanz sprechen.

Statistischer Vergleich der Werte des Kaltwasserversuches (10° C) mit denen des Warmwasserversuches (25° C)

Vergleich der einzelnen Thromboplastinzeiten bei jeweilig gleicher Wasserbadtemperatur

$$s_1 - s_2 = \text{Standardabweichung beider Kollektive}$$

Gehirn-TPZ bei 37° C Wasserbadtemperatur

$$s_1 - s_2 = 0,5456$$

$$t = 0,9532 \quad 0,4 > p > 0,3$$

bei 25° C

$$s_1 - s_2 = 0,5980$$

$$t = 1,3148 \quad 0,3 > p > 0,2$$

bei 15° C

$$s_1 - s_2 = 0,7241$$

$$t = 9,3124 \quad p < 0,001$$

Herz-TPZ bei 37° C

$$s_1 - s_2 = 3,7594$$

$$t = 1,5184 \quad p = 0,2 \quad p > 0,10$$

bei 25° C

$$s_1 - s_2 = 4,6306$$

$$t = 1,1028 \quad 0,3 > p > 0,2$$

bei 15° C

$$s_1 - s_2 = 7,4257$$

$$t = 1,8843 \quad 0,1 > p > 0,05$$

Milz-TPZ bei 37° C

$$s_1 - s_2 = 0,7156$$

$$t = 83,2662 \quad p < 0,001$$

bei 25° C

$$s_1 - s_2 = 6,073$$

$$t = 0,1026 \quad p > 0,9$$

Leber-TPZ bei 37° C

$$s_1 - s_2 = 8,9739$$

$$t = 9,5287 \quad p < 0,001$$

bei 25° C

$$s_1 - s_2 = 13,9930$$

$$t = 9,4113 \quad p < 0,001$$

bei 15° C

$$s_1 - s_2 = 19,3279$$

$$t = 6,0984 \quad p < 0,001$$

Nieren-TPZ bei 37° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 3,9267 \\ t &= 13,7650 \quad p < 0,001\end{aligned}$$

bei 25° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 4,0268 \\ t &= 9,6373 \quad p < 0,001\end{aligned}$$

bei 15° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 15,8997 \\ t &= 6,7973 \quad p < 0,001\end{aligned}$$

Kiemen-TPZ bei 37° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 3,6925 \\ t &= 6,9563 \quad p < 0,001\end{aligned}$$

bei 25° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 4,2889 \\ t &= 6,9178 \quad p < 0,001\end{aligned}$$

bei 15° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 7,3944 \\ t &= 3,1196 \quad 0,01 > p > 0,001\end{aligned}$$

Muskel-TPZ bei 37° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 6,0454 \\ t &= 1,7574 \quad 0,1 > p > 0,05\end{aligned}$$

bei 25° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 12,2553 \\ t &= 2,3541 \quad 0,05 > p > 0,02\end{aligned}$$

bei 15° C

$$\begin{aligned}s_1 - s_2 &= 31,6321 \\ t &= 1,5494 \quad 0,2 > p > 0,1\end{aligned}$$

Haut-TPZ bei 37° C

$$\begin{aligned} s_1 - s_2 &= 5,2769 \\ t &= 3,7243 \quad p < 0,001 \end{aligned}$$

bei 25° C

$$\begin{aligned} s_1 - s_2 &= 8,9522 \\ t &= 4,5143 \quad p < 0,001 \end{aligned}$$

bei 15° C

$$\begin{aligned} s_1 - s_2 &= 21,5108 \\ t &= 14,2615 \quad p < 0,001 \end{aligned}$$

Schleim-TPZ bei 37° C

$$\begin{aligned} s_1 - s_2 &= 10,8894 \\ t &= 0,8942 \quad 0,4 > p > 0,3 \end{aligned}$$

bei 25° C

$$\begin{aligned} s_1 - s_2 &= 20,1058 \\ t &= 2,4066 \quad 0,05 > p > 0,02 \end{aligned}$$

Betrachtet man die statistischen Ergebnisse im ganzen, so sind sowohl die Werte des Kaltwasserversuches als auch die des Warmwasserversuches in Beziehung zur jeweiligen Wasserbadtemperatur, bis auf wenige Ausnahmen, hochsignifikant.

Beim statistischen Vergleich des Kalt- mit dem Warmwasserversuch, bei jeweilig gleicher Wasserbadtemperatur, zeigen manche Thromboplastinzeiten (bei Gehirn, Herz, Milz und Muskulatur) teilweise keine Signifikanz.

D) DISKUSSION

Am schnellsten gerann bei jeder Messung Plasma, das mit Gehirnthrombokinase versetzt wurde. Mit einer durchschnittlichen Gerinnungszeit von 6,0 sec bei 37° C Wasserbadtemperatur im Kaltwasserversuch (10° C) läuft die Gerinnung des Karpfenplasmas fast um das Doppelte schneller ab als beim Menschen. Plasma von Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden, zeigte bei Zugabe von Gehirn-Thrombokinase einen leichten Anstieg auf 6,31 sec bei 37° C Wasserbadtemperatur. Bei 25° C Wasserbadtemperatur verzögerte sich die Gerinnung sowohl beim Kaltwasser- als auch beim Warmwasserversuch im Durchschnitt um fast 2 sec (7,86 bzw. 8,35 sec), um bei 15° C Wasserbadtemperatur 9,32 sec (Kaltwasserversuch) bzw. 13,28 sec (Warmwasserversuch) zu betragen. Es ist bemerkenswert, daß die sinkende Wasserbadtemperatur die Reaktionen verzögert, wogegen bei den Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden, eine schnellere Gerinnung zu beobachten ist als bei denen, die bei 25° C gehältert wurden. Die niedrigere Hälterungstemperatur hat scheinbar einen beschleunigenden Effekt auf die Gerinnungszeit ausgewirkt, doch kann diese Behauptung statistisch nicht abgesichert werden, da nur bei einer Wasserbadtemperatur von 15° C eine hohe Signifikanz beider Versuchsreihen zu ersehen war. Jeweils innerhalb des Warmwasser- (25° C) und des Kaltwasserversuches (10° C) konnte beim Vergleich der Werte von einer deutlichen Signifikanz ($p < 0,001$) gesprochen werden.

Beachtlich schnell führte auch Herzthrombokinase zur Gerinnung des Plasmas (21,9 sec bei 37° C Wasserbadtemperatur im Kaltwasserversuch und 24,37 sec im Warmwasserversuch). Jedoch lief hier der Gerinnungsablauf der Warmwasserversuchsreihe bei einer Wasserbadtemperatur von 25° C schneller ab als der der Kaltwasserversuchsreihe (26,21 sec - 28,97 sec). Allerdings zeigte die statistische Berechnung keine Signifikanz ($0,3 > p > 0,2$), wogegen ein statistischer Vergleich der Throm-

boplastinzeiten innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe (Warmwasser- oder Kaltwasserversuch) eine hohe Signifikanz erbrachte. Nur die Thromboplastinzeiten, die bei 37° C und 25° C gemessen wurden, konnten mit $0,2 > p > 0,1$ nicht als signifikant betrachtet werden.

Einen deutlichen Abfall der Thromboplastinzeit bei sinkender Wasserbadtemperatur sah man bei der Milz. Auch hier gilt die oben beim Gehirn gemachte Feststellung. Der Warmwasserversuch zeigte eine wesentliche Verlangsamung gegenüber dem Kaltwasserversuch. Bei einer Wasserbadtemperatur von 15° C konnte bei den bei 25° C gehälterten Karpfen überhaupt keine Gerinnung gemessen werden, wogegen das Plasma der bei 10° C gehälterten Tiere noch eine durchschnittliche Thromboplastinzeit von 163,33 sec aufwies. Die Thromboplastinzeiten der bei 10° C gehälterten Karpfen waren untereinander verglichen alle hochsignifikant.

Die rasche Thromboplastinzeit, die Nierengewebe bei einer Wasserbadtemperatur von 37° C im Kaltwasserversuch hervorrief (20,34 sec), fiel bei 25° C und 15° C Wasserbadtemperatur stark ab (40,62 sec bzw. 117,04 sec). Auch beim Warmwasserversuch war eine deutliche Verlangsamung der TPZ zu erkennen, die aber mit abnehmender Wassertemperatur deutlich abnahm. Betrug die Differenz der TPZ zwischen Warm- (25° C) und Kaltwasserversuch (10° C) bei 37° C Wasserbadtemperatur noch 93 % (39,19 sec bzw. 20,34 sec), so verkürzte sie sich bei 25° C und 15° C auf 33 % (54,29 sec zu 40,62 sec und 154,69 sec zu 117,04 sec). Bei beiden Geweben war der statistische Vergleich hochsignifikant.

Deutlich wurde der Einfluß der verschiedenen Hälterung (10° C und 25° C Wassertemperatur) der Karpfen bei den Thromboplastinzeiten, die mit Leberthrombokinasen zustande kamen. Plasma von Fischen, die bei 25° C gehältert wurden, zeigte bei einer Wasserbadtemperatur von 37° C eine Gerinnungsdauer, die jene der bei 10° C gehälterten Tiere um über das Doppelte (118 %) übertraf. Allerdings verkürzte sich die Relation bei

sinkender Wasserbadtemperatur (93 % bei 25° C und 28 % bei 15° C). Eine Erklärung für die langsame Angleichung könnte sein, daß Enzyme mit größerer Aktivität bei sinkender Umgebungstemperatur auch schneller an Aktivität verlieren. Sämtliche Ergebnisse waren hochsignifikant.

Das Kiemengewebe schien vergleichsweise zu anderen Organen viel Gewebsthrombokinasen zu enthalten. Es ließ Fischplasma des Kaltwasserversuches (10° C) bei 37° C Wasserbadtemperatur in 19,53 sec gerinnen. In diesem Zusammenhang sei das Lungengewebe der Säugetiere erwähnt, das nach dem Gehirn die meiste Gewebsthrombokinasen enthält. Im Warmwasserversuch war ebenfalls eine deutliche Verlängerung der Thromboplastinzeit zu erkennen. Trat bei 37° C Wasserbadtemperatur eine Verlängerung der TPZ von etwa 43 % gegenüber dem 10° C-Versuch auf, so verkürzte sich die Relation bei 25° C Wasserbadtemperatur auf ungefähr 35 %, um bei 15° C nur noch 15 % auszumachen (34,95 sec zu 25,71 sec bei 25° C, 61,28 sec zu 52,9 sec bei 15° C). Alle gemessenen Werte zeigten im Vergleich zueinander eine hohe Signifikanz.

Bei der Muskulatur traf die bereits häufig erwähnte Beobachtung zwischen den Kaltwasser- und Warmwasserversuchen bei 37° C und 25° C Wasserbadtemperatur zu. Gerann das Karpfenplasma bei 37° C Wasserbadtemperatur in 29,08 sec (Kaltwasserversuch) und in 51,0 sec bei 25° C Wasserbadtemperatur, so verlängerte sich die Gerinnungszeit beim Warmwasserversuch in 37° C Wasserbadtemperatur um ca. 13 % auf 32,98 sec, um bei 25° C Wasserbadtemperatur 55,29 sec (8 % Verlängerung der Gerinnungszeit) zu betragen.

Die Haut, ein wichtiges Organ für den Fisch, da sie ihn unmittelbar mit der Umwelt in Kontakt bringt, ließ im Kaltwasserversuch bei 37° C und 25° C Wasserbadtemperatur Karpfenplasma relativ schnell koagulieren (26,29 sec bzw. 48,89 sec), wogegen bei 15° C eine TPZ von durchschnittlich 158,02 sec zu erzielen war. Beim Warmwasserversuch jedoch gerann das Karpfenplasma bei Zugabe von Hautthrombokinasen bei allen Wasserbadtemperaturen schneller (18,15 sec bei 37° C, 34,63 sec bei 25° C, 49,57 sec

bei 15° C). Warum gerade bei der Hautthrombokinasen das Karpfenplasma im Warmwasserversuch durchgehend schneller als im Kaltwasserversuch gerann, konnte nicht geklärt werden. Schutzvorgänge des Körpers gegenüber der relativ hohen Umgebungstemperatur von 25° C könnten eine Rolle spielen, da die Haut neben den Kiemen das erste Organ ist, das mit äußeren Einflüssen konfrontiert wird. Vielleicht könnte man den Grund für die oben angeführten, vergleichsweise raschen Thromboplastinzeiten von Karpfenplasma - mit Kiementhrombokinasen zur Reaktion gebracht - auch in dieser Richtung suchen. Daß DOOLITTLE und RUSSEL (1962) in der Haut des Hundshais (*Mustelis canis*) wäßrige Gewebsextrakte, deren Zusammenhang nicht geklärt wurde, fanden, die eine starke Beschleunigung der Gerinnung hervorriefen, sei in diesem Zusammenhang erwähnt.

Bemerkenswert ist, daß getrockneter Schleim Thrombokinasen enthielt und im Kaltwasserversuch mit Gerinnungszeiten von 26,9 sec bei 37° C Wasserbadtemperatur, 41,87 sec bei 25° C und 122,93 sec bei 15° C Wasserbadtemperatur durchaus den anderen Gewebsthrombokinassen annähernd ähnliche Werte lieferte. Beim Warmwasserversuch verursachte Schleimthrombokinasen mit sinkender Wasserbadtemperatur einen deutlichen Abfall der TPZ, um bei 15° C überhaupt keine Werte mehr zu liefern. Waren die Werte innerhalb der einzelnen Versuchsreihen verglichen, hochsignifikant, so zeigte eine Gegenüberstellung des Kalt- mit dem Warmwasserversuch bei den Thromboplastinzeiten keine Signifikanz.

Betrachtet man die einzelnen Gewebsthrombokinassen untereinander, so ist klar zu erkennen, daß die schnellste Gerinnung des Plasmas bei Zugabe von Gehirnthrombokinasen erfolgte. Bei den anderen Gewebsthrombokinassen konnte über die Reihenfolge, wie schnell sie das Karpfenplasma gerinnen ließen, keine Aussage gemacht werden.

Dagegen übte die Temperatur des Wasserbades einen sichtlichen Einfluß auf den Gerinnungsvorgang aus.

Alle Thromboplastinzeiten des Plasmas zeigten eine deutliche Verzögerung bei absinkender Temperatur des Wasserbades, um bei 15° C teilweise sogar keine meßbaren Werte zu liefern.

BOGENRIEDER (1950) beobachtete diese Tatsache ebenfalls. Bei ihm lag die postmortale intravasale Blutgerinnung im Atrium des Karpfenherzens nach Behandlung mit Digipuratum bei $16 - 18^{\circ}\text{C}$ in $4\frac{1}{2}$ Std., bei 25°C in $3\frac{1}{2}$ Std. und bei 35°C in 3 Std. Allerdings beobachtete er diesen Vorgang nur grob makroskopisch.

Auch JARA (1957) stellte eine Abhängigkeit der Gerinnungszeit von den Temperaturen fest. Bei Raumtemperaturen gerann Blut im nicht paraffinisierten Röhrchen in 7 Minuten, bei 37°C in 4 Minuten. Oxalisiertes Plasma koagulierte bei 37°C in durchschnittlich 6,8 sec. Dies würde etwa der Thromboplastinzeit des Gehirns entsprechen, die in diesen Versuchsreihen ermittelt wurde.

MACNAB und RONALD (1965) bestätigten ebenso einen sehr beträchtlichen Einfluß der Temperaturen auf den Gerinnungsvorgang. Zeigte Kabeljau-plasma bei 0°C erst nach 2700 sec den ersten Fibrinfaden, so trat er bei 30°C bereits nach 88 sec auf.

Die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Temperatur bestätigte sich auch in den Versuchen von KOMATSU und MILLER (1970), bei denen die Blutgerinnung von *Salmo gairdneri* Richardson und *Trematomus borchgrewinki* zwischen 20 und 30°C schneller ablief als bei 0°C . Allerdings nahmen sie kein Plasma, sondern beobachteten die Gerinnung am Gesamtblut. Wahrscheinlich muß man sich aus diesem Grunde die längeren Gerinnungszeiten beim Karpfen erklären, dessen Blut bei 10°C in etwa 300 sec, bei 15°C in etwa 100 sec, bei 25°C in ungefähr 50 sec und bei 37°C in ca. 30 sec gerann. Auf die Tatsache, daß das Blut bei 42°C erst in 110 sec und bei 52°C in 200 sec gerann, um bei noch höheren Temperaturen überhaupt nicht mehr zu koagulieren, wird später noch eingegangen werden.

Der hohe Gehalt an Fibrinogen im Karpfenplasma (1,43 g % im Kaltwasserversuch bzw. 1,68 g % im Warmwasserversuch) könnte, wie bereits FLEMMING (1954) behauptete, eine Ursache für die schnellere Gerinnungszeit des Karpfenblutes gegenüber dem Blut der Säugetiere sein.

Die Hitzefibrinogenbestimmung nach Schulz führte zu keinem Ergebnis, da Karpfenplasma einen hitzelabilen Faktor besitzt, der bei Temperaturen über 52° C irreversibel zerstört wird (KOMATSU und MILLER, 1970). Wahrscheinlich konnten aus diesem Grunde MACNAB und RONALD (1965) bei Temperaturen über 37° C keine Gerinnung des Kabeljauplasmas mehr feststellen. Die Temperatur des Wasserbades übt einen sichtlichen Einfluß auf den Gerinnungsvorgang aus, jedoch scheint die Grenze zur irreversiblen Zerstörung der Eiweißkörper durch die Temperatur tiefer als bei den Säugetieren zu liegen (MACNAB und RONALD, 1965).

Das Blutgerinnungssystem der Karpfen dürfte, um sich anderen Autoren anzuschließen, ein ähnliches wie das der höheren Vertebraten sein. Enzymatische Reaktionen, die von ihren Umgebungstemperaturen abhängig sind, waren festzustellen. Der Gerinnungsvorgang lief optisch und in seiner Reihenfolge ähnlich ab. Sogenannte Spindelzellen, die den Thrombozyten der Säuger entsprechen dürften, waren festzustellen. Unterschiede scheinen nur im quantitativen Bereich zu liegen.

E) ZUSAMMENFASSUNG

1. Untersucht wurden die Gewebsthrombokinasen folgender Organe des Karpfens: Gehirn, Herz, Milz, Niere, Leber, Kiemen, Muskel, Haut und Schleim.

Eine Versuchsreihe wurde mit Karpfen, die bei 10° C gehältert wurden und eine mit Karpfen, die bei 25° C gehältert wurden, durchgeführt.

2. Die Gerinnung des Karpfenplasmas erfolgte durch alle Gewebsthrombokinasen sowohl im Kaltwasserversuch als auch im Warmwasserversuch, wobei die Thrombokinase des Gehirns jeweils die schnellsten Thromboplastinzeiten erzielte.
3. Bei den anderen Gewebsthrombokinasen konnte keine einwandfreie zeitliche Reihenfolge festgestellt werden, wie sie das Karpfenplasma gerinnen ließ.
4. Sinkende Wasserbadtemperaturen (37° C, 25° C, 15° C) verlangsamten den Gerinnungsvorgang. Einige Gewebsthrombokinasen lieferten bei 15° C überhaupt keine Werte mehr.
5. Der Fibrinogengehalt des Karpfenplasmas beträgt durchschnittlich 1,5 g %. Das Fibrinogen ist hitzelabil.
6. Die Blutgerinnung scheint beim Karpfen gleich der der Säuger zu sein und sich von ihr nur quantitativ zu unterscheiden.

Examinations of the time of coagulation of blood plasm by different thromboplastin of tissues of the carp (*Cyprinus carpio* L.) in dependence of the temperature

SUMMARY

1. There have taken place examinations of the thromboplastin of tissues of the following organs of the carp: the brain, the heart, the spleen, the kidney, the liver, gills, the muscles, the skin and the slime.

It was carried out a series of examinations with carps that had been kept at a temperature of 10° C and another series with carps that had been kept at 25° C.

2. The coagulation of the carp plasm happened in all thromboplastin of tissues, in the cold water experiments as well as in the warm water experiments. In both experiments the thromboplastin of the brain reached the quickest thromboplastin times.
3. With the other thromboplastin of tissues no clear chronological process of the coagulation of carp plasm could be realized.
4. Dropping water temperatures (37° C, 25° C, 15° C) slowed down the process of coagulation. At a temperature of 15° C some thromboplastin of tissues showed no values at all.
5. The average fibrinogen in the carp plasm is 1,5 g %, The fibrinogen is labile against heat.
6. The coagulation process of the blood of a carp seems to be the same as of the mammalia and differs from it only quantitatively.

G) LITERATURVERZEICHNIS

ARCHER, R. K. (1970): Blood coagulation in non-human vertebrates
Symp. Zool. Soc. Lond. 27, 121 - 132

BEAMS, H. W. und SEHNON, S. S. (1966): Fine structure of the red
blood cells and thrombocytes of the young trout (*Salmo gairdneri*)
J. Cell. Biol. 31, 11 A

BELSARE, D. K. (1975): Haematological studies in teleosts
I. A study of blood in some freshwater teleosts
Zool. Pol. 25, (2 - 3) 55 - 63

BOGENRIEDER, J. (1950): Die postmortale intravasale Blutgerinnungs-
zeit bei Fischen in ihrer Beziehung zur Todesursache und ihre Ver-
wendbarkeit zur Aufklärung von Massensterben.
Vom Wasser 18, 141 - 170

BONNIER, G., TEDIN, O. (1959): Biologische Variationsanalysen,
Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin

BORN, G. V. R. (1970): The functional physiology of blood platelets.
Symp. zool. Soc. Lond. 27, 75 - 89

BRUNS, A. (1966): Untersuchungen zur Blutgerinnung beim Huhn mit
Übergeordneten Bestimmungsmethoden. Vet. Med. Diss. Univ. München

CHLEBECK, A. und PHILLIPS, G. L. (1969): Hematological study of two
buffalofishes, *Ictiobus cyprinellus* and *Ictiobus bubalus* (Catostomidae)
J. Fish. Res. Bd. Canada 26, (11) 2881 - 2886

DAVIE, E. W. (1964): Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.
Science 145, 1310 - 1312

DOMBROWSKI, H. (1953): Das Blut des gesunden Karpfens. Fischwirt 3, 345 - 348

DOMBROWSKI, H. (1953): Untersuchungen über das Blut des Karpfens und einiger anderer Süßwasserfischarten. Biol. Zentralblatt 72, 182 - 195

DOMBROWSKI, H. (1954): Das Blut einiger Süßwasserfische. Fischwirt 2, 45 - 46

DOMBROWSKI, H. (1954): Das Blut des bauchwassersuchtkranken Karpfens, Fischwirt 4, 9 - 11

DOOLITTLE, R. E. (1963): Further studies on clotting and fibrinolysis in plasma from the Smooth Dogfish. Brit. J. Hemat. 9, 464 - 470

DUTHIE, E. S. (1938/39): The origin development and function of blood cells in certain marine teleosts. J. Anat. 73, 396 - 412

EASTHAM, R. D. (1968): Klinische Hämatologie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

FARNER, D. S., KING, J. R., PARKES, K.C. (1972): Avian Biology, Vol. II, Academic Press, London-New York

FERGUSON, J. H. (1943): A new blood-clotting theory. Science 97, 319 - 322

FEY, F. (1966): Vergleichende Hämatologie niederer Vertebraten. II. Thrombozyten. Fol. Haemat. 85, 205 - 217

FIELD, J. B., ELVEHJEM, C. A. and CHANCEY JUDAY (1943): A study of the blood constituents of carp and trout. J. Biol. Chem. 148, 261 - 269

FIJAN, N. (1961): Die hämatopoetische Funktion der Niere bei einigen Süßwasserfischen. Bioloski Glasnik 14, 167 - 214

FLEMMING, H. (1954): Über den Fibrinogengehalt des Karpfenblutes. Zeitschr. für Fischerei, N.F. III, 337 - 342

FLOKIN, M. und SCHEER, B. T. (1974): Chemical Zoology, Vol. VIII, Academic Press New York, London

FOURIE, F. le R. and HUTTING, J. (1976): A seasonal study of the hematology of carp from a locality in the Transvaal South Africa. Zool. Africa 11, 75 - 80

FRY, H. J. B. (1909): Blood platelates and the coagulation of the blood in marine chordata. Fol. hämat. 467 - 503

GARDNER, G. R. and YEVICH, P. P. (1969): Studies on the blood morphology of three estuarine Cyprinodontiform fishes. J. Fish. Res. Board of Can. 26, 433 - 447

GORDON, L. (1926): Untersuchungen über die Spindelzelle im Blute von Tieren mit kernhaltigen roten Blutzellen, ihre eigentliche Gestalt, Abstammung und funktionelle Bedeutung. Virch. Arch. 262, 19 - 38

HAIDER, G. (1967): Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopese einiger Teleostier. I. Beobachtungen an Zellen der roten Reihe. Zoo. Anz. 179, 355 - 384

HAIDER, G. (1968): Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopese einiger Teleostier. II. Beobachtungen an Spindelzellen. Zool. Anz. 179, 384 - 409

HAIDER, G. (1968): Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. III. Beobachtungen an Leukozyten und Plasmazellen. Zool. Anz. 180, 110 - 130

HAIDER, G. (1968): Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. IV. Blutbildungsstätten und Blutbildung. Zool. Anz. 181, 203 - 226

HALLMANN, L. (1966): Klin. Chemie und Mikroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

HARMS, J.W., LIEBER, A. (1970): Zoobiologie für Mediziner und Landwirte. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

HAWKEY, C. M. (1970): General summary and conclusion, Symp. zool. Soc. London 27, 217 - 229

HENNE, H. (1967): Untersuchung über die II. Blutgerinnungsphase des Huhnes. Vet. Med. Diss. der Univ. München

JARA, Z. (1957): The blood coagulation system in carp (Cyprinus carpio L.) Zool. Pol. 8, (2 - 3) 113 - 129

JARA, Z. (1958/59): Das Blutgerinnungssystem des Karpfens (Cyprinus carpio L.) Wiss. Zeitschr. der Ernst Moritz Arndt-Universität Greifswald, Jahrgang VIII

JARA, Z. (1961): Studies on the mechanism of thrombinogenesis in carp (Cyprinus carpio L.) Zool. Pol. 11, (2) 101 - 129

KOMATSU, S. K., MILLER, H. T., DEVRIES, A. L., OSAGA, D. T. and FEENEY, R. E. (1970): Blood plasma proteins of cold-adapted antarctic fishes. Comp. Biochem. Physiol. 32, 519 - 527

KRESS, H. Frh. von (1966): Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik, Verlag von J. F. Bergemann, München

LANGDELL, R. D., BRIAN, F. T. and GIBSON, Jr. W. S. (1965): Coagulation of catfish blood. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 118, 439 - 441

LEE, R. I. and WHITE, P. D. (1913): A clinical study of the coagulation-time of blood. Am. J. of the medical sciences 145, 495 - 503

LEHMANN, J. und STÜRENBERG, F. J. (1974): Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson) I. Methodik zur Blutentnahme und Blutuntersuchung bei Fischen. Gewässer und Abwässer 53/54, 114 - 132

LEHMANN, J. und STÜRENBERG, F. J. (1974): Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson) II. Beschreibung und Darstellung der wichtigsten Zellen in der Blutbildungsstätte und im peripheren Blutsystem. Verlag H. Kalteneier & Söhne, Krefeld-Hüls

LEUTELT, R. (1960): Das weiße Blutbild des gesunden und an infektiöser Bauchwassersucht erkrankten Karpfens. Vet. Med. Diss. Univ. München

MACFARLANE, R. G. (1964): An enzyme cascade in the blood clotting mechanism. and its function as a biochemical amplifier. Nature 202, 498 - 499

MC KNIGHT, I. M. (1966): A hematological study on the mountain white fish *Prosopium williamsoni*. J. Fish. Res. Bd. Canada, 23, (1) 45 - 64

MACNAB, H. C. and RONALD, K. (1965): Blood clotting time of the Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Fish. Res. Bd. of Can. 22 (2), 1299 - 1301

MOLNAR, G. (1960): Methode der Blutentnahme für hämatologische Untersuchungen bei Fischen. Z. Fisch. 9, 101 - 106

MEYER-BERTENRATH, J. G. (1973): Blutgerinnung und Fibrinolyse. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Löwenich, Kreis Köln

MÜLLER, F. (1963): Untersuchungen zur II. u. III. Phase der Blutgerinnung beim Huhn. Vet. Med. Diss. Univ. München

MÜLLER, F., SEIFERT, O. (1966), Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik, 69. Neubearbeitete Auflage, Verlag von J. F. Bergmann, München

NEALE, N. L., HONN, K. V. and CHAVIN, W. (1977): Hematological responses to thermal acclimation in a cold water squaliform (*Heterodontus francisci* Girard). J. Comp. Physiol. 115 (2), 215 - 222

NOLF, P. (1906) La coagulation du sang des poissons. Arch. inter. Physiol. 4, 216 - 225

OWREN, P. A. (1953): Prothrombin and accessory factors. Clinical significance. Am. J. Med. 14, 201 - 215

POSTON, H. (1964): Effect of dietary vit K and sulfaguanidine on blood coagulation time, microhematocrit, and growth of immature brook trout. Progr. Fish Cult. 26, 59 - 64

QUICK, A. J. (1935): On various properties of thromboplastin (Aqueous tissue extracts). Am. J. Physiol. 114, 282 - 296

QUICK, A. J. (1947): On the quantitative relationship between calcium and prothrombin. Am. J. of Physiol. 148, 211 - 221

REICHENBACH-KLINKE, H. H. (1966): Krankheiten und Schädigungen der Fische. Verlag Fischer Stuttgart

RENNER, E. (1970): Mathematisch-statistische Methoden in der praktischen Anwendung. Paul Parey-Verlag, Berlin und Hamburg

RICHTERICH, R. (1971): Klinische Chemie. Theorie und Praxis. S. Karger Verlag, Basel, München, New York, Sydney

ROMEIS, B. (1968): Mikroskopische Technik. Oldenburg-Verlag, München, Wien. 16. Auflage

RUSSEL, F., DOOLITTLE, R. F. and SURGENER, D. M. (1962): Blood coagulation in fish. Am. J. Physiol. 203, 964 - 969

RUSSEL, F., DOOLITTLE, J., LAWRENCE ONCLEY, DOUGLAS, M. S. (1962): Species differences in the interior of thrombin and fibrinogen. J. Biol. Chem. 237, 3123 - 3127

SCHMIDT E. und F.W. (1966): Enzym-Fibel. C.F. Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim

SCHWICK, G. (1961): Beiträge zur Diagnostik von Gerinnungsstörungen. Laboratoriumsblätter für die med. Diagn. 1, Behring AG, Marburg/Lahn

SOIVIO, A., NYHOLM, K. and HUHTI, M. (1977): Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish. Biol. 10 (1), 91 - 101

STEFANINI, M. D. (1953): Mechanism of blood coagulation in normal and pathologic conditions. Am. J. Med. 14, 64 - 86

TOPF, W. (1955): Die Blutbildung und die Blutbildungsstätten beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). Zeitschr. Fischerei und deren Hilfswissenschaften IV NF H3/4, 257 - 288

TOPF, W. (1959): Das Verhalten der Thrombozytoblasten und der Leukozyten des Karpfens im Dunkelfeld. Zool. Anz. 163, 190 - 193

TRNBISCH, H.: Der kleine Gerinnungsstatus. Beiträge zur Diagnostik von Gerinnungsstörungen I., Laboratoriumsblätter für med. Diagnostik, Behringwerk AG, Marburg/Lahn

WELSCH, U. und STORCH, V. (1973): Einführung in Cytologie und Histologie der Tiere. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

WERLBERGER, B., WEIGER, G. (1978): Eine praxisgerechte Methode zur Bestimmung der Thromboplastinzeit. Tierärztl. Praxis 6 (1) 119 - 123

WOLF, K. (1959): Plasmoptysis and gelation of erythrocytes in coagulation of blood of fresh-water bony fishes. Blood 14, 1339

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-H. Reichenbach-Klinke für die Überlassung des Themas sowie die jederzeit gewährte wissenschaftliche Beratung.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. B. Ollenschläger für zahlreiche Anregungen bei der Anfertigung der Arbeit sowie den Damen und Herren des Institutes für Zoologie und Hydrobiologie, die mir bei vielen Problemen wertvolle Hilfe geleistet haben.

Großer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. R. Marx, Leiter der hämostatischen Abteilung der I. Med. Klinik der Universität München und seinen Mitarbeitern, in dessen Räumen ich mir die für die Arbeit erforderliche Technik aneignen durfte.

LEBENS LAUF

Am 14.6.1947 wurde ich, Helmut Burzynski, als Sohn des Buchhalters Walter Burzynski und dessen Ehefrau Elsa, geb. Förster, in Pfaffenhofen/Ilm geboren.

Von 1953 - 1959 besuchte ich die Volksschule Pfaffenhofen/Ilm und trat dann in das Musische Gymnasium in Eichstätt über, das ich 1967 mit dem Abitur abschloß. Im gleichen Jahr begann ich mein Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. 1972 legte ich mein Staatsexamen ab. Bis 1978 war ich 4 Jahre lang in der Praxis tätig.

